

Desenvolvimento de fármacos inibidores de CD36 com potencial terapêutico no cancro da próstata

Samuel Dinis Mendes Ruivo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2^o ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre
Co-orientadora: Doutora Cátia Alexandra Vicente Vaz
Co-orientador: Mestre João Paulo Lourenço Serrano

Outubro de 2021

Folha em branco

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Samuel Martins Silvestre, e aos meus coorientadores, Doutora Cátia Alexandra Vicente Vaz e Mestre João Paulo Lourenço Serrano. Foi um privilégio ter tido a oportunidade de ter sido por eles acompanhado durante estes meses, não só pela paciência e disponibilidade, mas acima de tudo pela confiança que me foi sempre depositada. Espero, muito sinceramente, que de alguma forma, tenha conseguido retribuir um pouco, com algum empenho.

Ao Professor Doutor Paulo Jorge da Silva Almeida, que se mostrou também sempre acessível e bem disposto e que, a par com o meu coorientador e orientador, foi fulcral para que a parte de química corresse tão bem.

À professora Doutora Sílvia Socorro, agradeço a possibilidade de ter integrado o seu grupo de investigação e também por ter disponibilizado as condições para desempenhar os ensaios biológicos.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente aqueles com que pude não só ter a oportunidade de conviver, como também a possibilidade de aprender imenso. Destas pessoas, destaco a Marina Posso, a Lara Fonseca, a Mariana Freijó e a Catarina Serra, que, ao acompanharem-me, também tornaram possível que esta etapa fosse concluída. A todos vós, um enorme obrigado!

À Ana Margarida, aquela irmã que adotei pela Covilhã, que durante a licenciatura e mestrado sempre esteve presente, que me incentivou e apoiou em todas as situações, sou muito grato por tudo!

A todos que ao longo destes anos me acompanharam, quer na faculdade, aos ex-colegas de trabalho do McDonalds Serra Shopping, ao Sr. Vitor e a todas as pessoas, que ao darem-me a chance de trabalhar convosco, contribuíram indiretamente na minha formação académica, um muito obrigado.

Finalmente, mas não menos importante, queria agradecer aos meus pais, que, de várias formas, também foram essenciais para ser quem sou e para poder avançar nesta etapa.

Folha em branco

Resumo

O cancro da próstata é o segundo cancro mais diagnosticado na população masculina, em todo o mundo. Dado o envelhecimento da população, é uma patologia muitas vezes associada a outras doenças metabólicas crónicas. Curiosamente, na esmagadora maioria delas, verifica-se um grande contributo do cluster de diferenciação 36 (CD36), que age como mediador do influxo de ácidos gordos de cadeia longa, através da membrana celular e organelos membranares. Esta proteína desempenha alguns papéis no metabolismo lipídico e em algumas vias de sinalização celular e, quando é sua sobre-expressa, é um biomarcador no cancro da próstata. Este trabalho de dissertação teve como principais objetivos o design, síntese, caracterização das propriedades estruturais, atividades biológicas e aplicabilidades de híbridos de ácidos (tio)barbitúricos e ácidos gordos como potenciais inibidores do CD36. Assim, foram realizados estudos computacionais para simular parâmetros farmacocinéticos, druglikness e de inibição do CD36, respetivamente, por ferramentas online de ADMET, e de docking molecular. Adicionalmente, foram realizados estudos *in vitro* visando a determinação da actividade anti-proliferativa dos vários compostos e também a inibição do influxo lipídico em células de cancro da próstata, através do marcador *bodipy*-C16. Como resultado das tarefas de síntese, foram obtidos 19 compostos e 18 dos seus sais respetivos, apresentando rendimentos entre bons e excelentes (44 a 92%). No que diz respeito ao *docking* molecular, observou-se, em geral, um aumento das energias de ligação com o aumento das cadeias carbonadas. No entanto, a presença de insaturações levou a que as energias determinadas estagnassem, tendo sido analisado então as interações em detalhe. Posto isso, foram realizados screenings de viabilidade celular, e foram seleccionados os compostos para IC₅₀, tendo sido verificado que, destes, o composto mais promissor era o derivado de ácido araquidónico, apresentando atividade anti-proliferativa significativa, sendo, simultaneamente, específico para as linhas celulares tumorais. O composto mais citotóxico foi o derivado de ácido esteárico, no entanto, não apresentou seletividade para as células tumorais. Finalmente, os resultados do screening da inibição de CD36, parecem deixar antever que o derivado de ácido 10-undecenóico é o mais promissor, apresentando inibição em ambas as linhas celulares tumorais. Não obstante estes resultados promissores serão necessários trabalhos adicionais para avaliar futuras otimizações dos compostos sintetizados e ainda possibilitar uma compreensão completa das potencialidades dos compostos desenvolvidos.

Palavras-chave

Inibição do CD36; Cancro da próstata; Estudos computacionais; Síntese química; Viabilidade celular.

Abstract

Prostate cancer is the second most diagnosed cancer in the men's population. Besides the growth of the aged population, it is frequently combined with other chronic metabolic diseases. Curiously, the majority of them have a great contribution of the cluster of differentiation 36 (CD36), that mediates uptake of long-chain fatty acids (FA) through the cell membrane and other membrane-bound organelles. This protein plays some roles in lipid metabolism and cell signaling pathways and this overexpression is watched as a biomarker for prostate cancer. This work aims to promote the design, synthesis and spectroscopic characterization of (thio)barbiturates functionalized with fatty acid's chains, likewise *in silico* studies of absorption, distribution, metabolization, excretion and toxicity (ADMET) and molecular docking, and finally, perform *in vitro* studies of antiproliferative activities, by MTT, and inhibition of FA uptake using bodipy-C16 as well in prostate cancer cells. As a result of synthesis we obtained 18 compounds and the sodium enolates correspondents between good to excellent yields (44-92%). Furthermore, with the molecular docking results, we observed that the binding energies grow proportionally with the size of the chain FA, but decrease with isomerization trans, and more than 2 unsaturation. Considering the antiproliferative studies, the initial screening showed that the cytotoxicity of prostate cancer cells increased with the size of the chain's FA. However, the selectivity for tumoral cells grows with the presence of unsaturation *cis*. The calculations of the half of the maximum inhibitory concentration (IC_{50}) determined that the most potent antiproliferative compound was the arachidonic acid derivative and was also the most selective. Finally, the bodipy-C16 assay shows that all synthesized compounds have inhibitory activity and in this way the most promising one is the derivative of 10-undecenoic acid. However, more biological studies in this context will be required, in order to elucidate the potential structural optimization of molecules and make a full overview of the pathways favorable to these findings.

Keywords

CD36 inhibition; Prostate cancer, Computational studies; Chemical synthesis; Cellular viability.

Folha em branco

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Anatomia e fisiologia da próstata	1
1.2 Cancro da próstata	3
1.2.1 Alterações <i>metabólicas no cancro da próstata</i>	4
1.2.1.1 Disfunções no metabolismo energético.....	5
1.2.1.2 Dependência de androgénios	7
1.3 CD36.....	9
1.4 AG e seus derivados.....	14
1.5 Ácidos (tio)barbitúricos e seus derivados	15
2. Objetivos.....	19
3. Materiais e Métodos	20
3.1 Estudos computacionais	20
3.1.1 <i>Docking</i> molecular	20
3.1.1.1 Preparação da proteína e ligandos	20
3.1.1.2 <i>Docking</i> molecular em Autodock Vina	21
3.1.1.3 Representação das interações proteína-ligando	21
3.1.2 Previsão dos perfis farmacocinéticos e de <i>druglikeness</i>	21
3.2 Síntese de ácidos barbitúricos funcionalizados com AG	22
3.2.1 Ácidos barbitúricos funcionalizados com AG.....	23
3.2.1.1 Híbridos de ácido <i>N,N'</i> -dimetilbarbitúrico e AG	23
3.2.1.2 Sais dos híbridos de ácido <i>N, N</i> -dimetilbarbitúrico e AG	32
3.4. Avaliação biológica dos compostos sintetizados	42
3.4.1 Avaliação da Proliferação Celular.....	43
3.4.1.1 Culturas Celulares	43
3.4.1.2 Passagem e contagem de células	43
3.4.1.3. Preparação de Soluções dos compostos em estudo	44
3.4.1.4. Ensaio de Viabilidade Celular pelo método de MTT	45
3.4.1.5. Ensaio do influxo de AG através do método Bodipy-C16 e Hoescht 33342	45
3.5 Análises Estatísticas.....	46
4. Resultados e discussão	47
4.1 Estudos computacionais	48
4.1.1 <i>Design</i> e <i>docking</i> molecular prévio	48
4.1.2 <i>Docking</i> molecular pós-síntese	52

4.1.3	Previsão de perfis farmacocinéticos e de druglikness	54
4.2	Síntese dos híbridos de ácidos (tio)barbitúricos e AG.....	60
4.3	Avaliação Biológica	64
4.3.1	Avaliação do efeito dos compostos na viabilidade Celular	64
4.3.1.1.	Ensaio da viabilidade celular através de MTT	64
4.3.1.1.1.	<i>Screening</i> inicial	65
4.3.1.1.2.	IC ₅₀	71
4.4	Avaliação do influxo de lípidos	73
4.4.1	BODIPY	74
4.4.1.	Estudo cinético	74
4.4.2.	Estudo de avaliação do influxo lipídico	75
5.	Conclusão e perspectivas futuras	77
6.	Referências bibliográficas.....	79
7.	Anexos.....	85
7.1	Docking moléculas com Autodock Vina	85
7.2	Publicações fora do âmbito da dissertação	96

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação anatômica da próstata humana. Adaptado de De Marzo <i>et al.</i> ³1	
Figura 2- Balanço influência de substâncias endócrinas e exógenas no estado de ativação dos RA..... 2	
Figura 3- Representação dos processos de iniciação e progressão do cancro da próstata (Adaptado de Chan <i>et al.</i> ⁴) 3	
Figura 4- Representação dos 6 principais <i>hallmarks</i> do cancro. Adaptado de D. Hanahan <i>et al.</i> ¹³ 4	
Figura 5- Evolução dos metabolismos energéticos de acordo com a iniciação e progressão tumorais. (Adaptado de C. Mah <i>et al.</i> ⁹) ACC: Acetil-CoA Carboxilase; α -CG: α -cetogluturato; V-RA: Variantes de RA; SAG: Sintase de AG..... 5	
Figura 6- Representação das interações estabelecidas entre adipócitos extracelulares, transportadores de AG, dependência de androgénios, expressão génica e metabolismo lipídico. Adaptado de Mah, C <i>et al.</i> ⁹ 9	
Figura 7- Modelos estruturais do CD36: (A) estrutura cristalina, adaptado de Hsieh, F. <i>et al.</i> ; ²³ (B) modelo com locais de ligação, alguns ligandos, modificações pós traducionais, adaptado de W. Jingchun. ²⁶ 10	
Figura 8-Mecanismo de inibição irreversível do CD36 por parte do SSO através da formação de uma ligação covalente amida entre o resíduo de lisina 164 e a cadeia carbonada do SSO.12	
Figura 9 Representação estrutural das hidrazonas estudadas por A.Geloen <i>et al.</i> como potenciais inibidores reversíveis do CD36. ²⁶12	
Figura 10- Estrutura secundária do CD36, ligandos e modificações pós traducionais passíveis de serem alvos terapêuticos indiretos. ¹⁵13	
Figura 11- Representação da estrutura geral dos (tio)barbitúricos e respetiva numeração.16	
Figura 12- Influência da funcionalização dos (tio)barbitúricos ao nível dos azotos 1 e 3 e carbono 5 na sua atividade inibitória sobre as MPM. ⁴³17	
Figura 13- Influência da adição de um grupo índole (bi)substituído em C5 na inibição das enzimas redutase e timidilato sintase. ⁴³ 18	
Figura 14- Influência da polaridade do grupo R2 na atividade inibitória sobre as sirtuínas.19	
Figura 15- Representação dos canais que convergem no centro ativo, locais de ligação e resíduos que favorecem cada uma das interações dos compostos de referência, obtido através do <i>software</i> Discovery Studio..... 52	
Figura 16-Estruturas mais prováveis dos tautómeros ceto-enólicos dos compostos 2..... 52	

Figura 17- Relação entre energias de ligação, obtidas no Autodock Vina, o aumento da cadeia carbonada saturada do composto e as formas cetó-enólicas a, b e c.	53
Figura 18- Gráfico Boiled Egg contendo a relação entre a ASP e LogP das moléculas 2a-s. São apresentados dados de AI, permeabilidade através da BHE e afinidade pela GP-P (vermelho - não é substrato; azul - é substrato).	55
Figura 19- Percentagem de viabilidade celular aquando da exposição das linhas celulares LNCaP, PC3 e PNT1A a soluções às concentrações de 10 e 50 µM dos compostos 9ab-sb, e do SSO (controlo negativo de citotoxicidade), durante o período de 24 horas. Os dados são apresentados com uma barra de erro ± desvio padrão, representativos de 2 ensaios independentes. * p<0,05; ** p<0.01; ***p<0,001; **** p<0,0001. Estando p expresso relativamente à responsividade de cada uma das linhas celulares a um dado composto. ANOVA one-way,(Teste de turkey).	70
Figura 20- Representação estrutural do Bodipy-C16.....	74
Figura 21- Cinéticas de influxo de Bodipy-C16 pelas linhas celulares e retas de calibração respetivas: (a) LNCaP e PC3(b).....	75
Figura 22- Percentagens de inibição do influxo lipídico nas linhas celulares tumorais de CPr, LNCaP e PC3, obtidas através da relação entre os ensaios fluorimétricos de Bodipy-C16 e Hoescht. Os compostos utilizados foram 2a-s(1 µM), SSO (1 e 25 µM) e ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (1 µM). As barras de erro indicam a média± desvio padrão. Sendo estes dados representativos de dois ensaios independentes. Tendo todos *p<0,05 em relação ao controlo negativo(ácido N,N'-dimetilbarbitúrico).	76

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Representação estrutural dos compostos de referência e propostos e respectivas energias de ligação para com a proteína CD36	49
Tabela 2 – Predição das interações dos compostos 2a-s para com as várias CYP450 através dos <i>softwares online</i> pkCSM e SwissADME.....	56
Tabela 3 – Dados relativos à excreção dos compostos.....	57
Tabela 4 – Dados relativos a potenciais toxicidades dos compostos.....	58
Tabela 5 – Dados relativos a aspetos de <i>druglikeness</i> dos compostos.	59
Tabela 6 – Dados referentes aos p.f. e η dos compostos resultantes. (1) Compostos na forma nativa; (2) Compostos na forma de sal sódico;.....	63
Tabela 7 - Dados referentes aos IC ₅₀ dos compostos cujo Screening demonstrou citotoxicidade significativa	71

Lista de Esquemas

Esquema 1 - Mecanismo geral das reações de condensação de <i>Knoevenagel</i> , em meio aquoso, possibilitando a funcionalização de (tio)barbitúricos no carbono 5. Adaptado de B. Dhorajiyi <i>et al.</i> ⁴⁵	16
Esquema 2- Planificação da síntese híbridos de (tio)barbituratos funcionalizados com AG, a partir da estrutura do SSO. Como exemplo de AG, a azul, está apresentado o ácido oleico.	48
Esquema 3- Síntese dos híbridos 2a-s e respetivos sais de sódio (2ab-sb), por reação de condensação dos ácidos N,N'-dimetilbarbitúricos e AG, catalizada por DCC e DMAP. Não se verificou a formação do híbrido 3.	61
Esquema 4 - Possíveis reações de condensação catalisadas pelo DCC e o DMAP. (Adaptado de Pesyan <i>et al.</i> ⁴⁷) Rota reacional A daria origem ao produto 2; Rota reacional B daria origem ao produto 3, havendo possibilidade de transformação de 3 em 2 (rota C), pela adição de DMAP e CH ₂ Cl ₂	62
Esquema 5- Redução do MTT a formazano mediada pela NADH desidrogenase.....	65

Folha em branco

Lista de Acrónimos

AB	Antibiótico e antimicótico
Ad	Adenocarcinoma diagnosticável
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGI	Absorção no trato gastro-intestinal
Al	Adenocarcinoma latente
ATCC	American type culture collection
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AEP	Antígeno Específico da Próstata
AG	Ácidos Gordos
BHE	Barreira hematoencefálica
CCF	Cromatografia de camada fina
CPr	Cancro da Próstata
CYP450	Citocromo P450
d	duplete
DHT	5-dihidrotestosterona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
GP-P	Glicoproteína P
FTIR	Espectros de infravermelho por transformada de Fourier - do inglês, <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
FAP	Fosfatase Ácida da Próstata
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima - do inglês, <i>Half-maximal inhibitory concentration</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MPM	Metaloproteinase de matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NIP	Neoplasia Intra-epitelial prostática
nm	Nanómetro
SAG	Sintase de AG
SFB	Soro fetal bovino
OCTS	Transportadores orgânicos catiónicos - do inglês, Organic cation transporters
PAINS	Compostos de interferência pan-assay- do inglês Pan-assay interference compounds

PDB	do inglês, <i>Protein Data Bank</i>
p.f.	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de próton
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	<i>Singlete</i>
SMILES	Sistema de especificação simplificada de entradas moleculares - do inglês, <i>simplified molecular input line entry specification</i>
SNC	Sistema nervoso central
t	Triplete
UK	United Kingdom
US	United States
η	Rendimento

1.Introdução

Ao longo deste capítulo serão apresentados dados presentes na literatura que mostram a importância crescente do estudo do cancro da próstata (CPr), incluindo alterações anatómicas e fisiológicas, consequências das disfunções metabólicas que levam ao despoletar da patologia e à resistência às terapias existentes. Adicionalmente, será feita uma contextualização das propriedades das famílias de compostos que se pretendiam hibridizar de forma a dar origem aos compostos tendo em mente a materialização do objectivo do objectivo 2.1..

1.1 Anatomia e fisiologia da próstata

A próstata trata-se de uma glândula acessória do sistema reprodutivo masculino que se encontra na base da bexiga e envolve a convergência entre os canais ejaculatórios e a uretra prostática.¹

As principais funções deste órgão são assegurar um ambiente tampão, isto é, com o pH estável entre 6 e 6,5, através da secreção de iões fosfato e cálcio,¹ e garantir a produção de outros componentes importantes do fluido prostático, que asseguram a fluidez do esperma, mobilidade e nutrição dos espermatozoides tais como o antígeno específico da próstata (AEP), a fosfatase ácida da próstata (FAP), citrato e sacarose.²

A próstata humana é constituída por cinco regiões (figura 1): zona de transição, zona periférica, zona central, zona pré-prostática e estroma fibromuscular.³ A maior região da próstata é a zona periférica, ocupando 70% do seu volume total, sendo também a zona de maior incidência do CPr.³

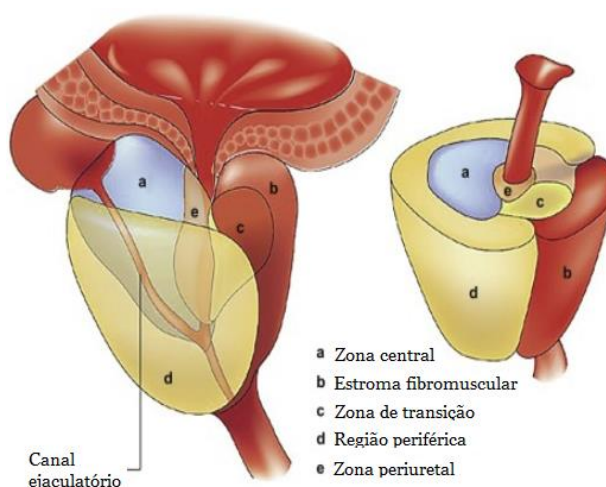


Figura 1 - Representação anatómica da próstata humana. Adaptado de De Marzo *et al.*³

O tecido prostático é constituído por células estromais e epiteliais. Entre as epiteliais distinguem-se dois tipos com morfologias diferentes, as células colunares luminares e as células basais. Destas, as células mais ativas são as células colunares luminares que também têm a particularidade de necessitarem do recetor de androgénios (RA), primeiramente para sobreviver e, em segundo lugar, para exercer a sua atividade secretória, pela produção do AEP e do FAP.^{2,4} Estas duas substâncias são vistas como biomarcadores no CPr, já que, nesta patologia, o FAP se encontra aumentado, enquanto o AEP diminui, comparativamente ao encontrado em indivíduos saudáveis.^{2,4} Quanto às células basais, estas não têm qualquer papel secretório. Existe ainda um terceiro tipo de células, as neuro-endócrinas, que, não sendo dependentes de androgénios, aparentam ter um papel na carcinogénese da próstata.⁴

Outros grupos celulares muito importantes no contexto de uma próstata saudável, são os fibroblastos e as células do músculo liso, uma vez que providenciam suporte estrutural e bioquímico ao restante tecido, principalmente pela influência que surtem nas células epiteliais da próstata.²

Dados referentes ao comportamento das células epiteliais da próstata demonstraram que estas têm os seus ciclos de vida, diferenciação e apoptose dependentes de androgénios, quer pela ativação dos recetores de androgénios (RA) por parte dos androgénios, quer pela intervenção de outras substâncias. Neste último caso, vão depender das interações que determinadas substâncias endógenas,^{1,2} especialmente o fator de crescimento epitelial (FCE), o fator de crescimento semelhante à insulina (FCI), o fator de crescimento fibroblástico (FCF) e o fator de crescimento transformante beta (FCT- β), e também de substâncias exógenas⁵, nomeadamente os disruptores endócrinos (DE), vão estabelecer para com os RA, como representado na figura 2. Sendo que se verifica que FCE, FCF, FCI exercem um efeito agonista, enquanto o FCT β exerce um antagonista sobre o estado de ativação dos RA. Já os DE possuem um comportamento ambivalente, podendo tanto ativar, quanto inibir estes recetores.

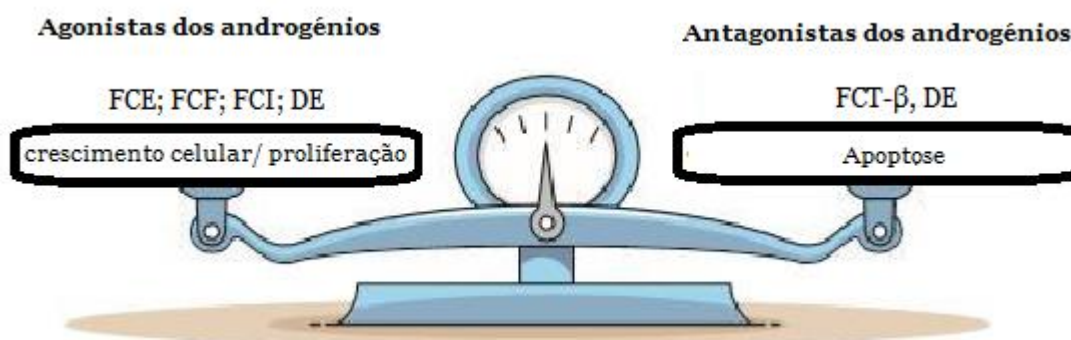


Figura 2- Balanço influência de substâncias endócrinas e exógenas no estado de ativação dos RA.

Assim, verifica-se que existe uma influência direta das substâncias anteriormente referidas sobre a ação dos androgénios, o que poderá estar relacionado com os estadios iniciais do CPr, embora tais substâncias também possam exercer influências indiretas.

1.2 Cancro da próstata

O CPr é o segundo tipo de cancro mais diagnosticado na população masculina em todo o mundo, representando cerca de 15% dos diagnósticos.^{6,7} Este tipo de cancro é particularmente agressivo e difícil de tratar quando em estadios mais avançados, dada a aquisição de resistência às terapias/fármacos mais comumente utilizados e à sua alta taxa de metastização.^{8,9} Por outro lado, verifica-se que o CPr afeta maioritariamente homens de idade mais avançada, que, muitas vezes, possuem outras doenças metabólicas associadas, as quais também contribuem para o desenvolvimento do cancro¹⁰ (Diabetes melitus tipo 2, dislipidemias, obesidade, entre outras).

O desenvolvimento do CPr resulta do acumular de mutações, fuga aos pontos de controlo do ciclo celular e à vigilância do sistema imunitário, entre outros fatores, o que vai conferir às células neoplásicas vantagens metabólicas e, conseqüentemente, proliferativas, relativamente às células normais.¹¹ Essas mudanças do fenótipo celular vão estar interligadas com a evolução de uma célula, desde o estadio normal, até ao estadio de metastização, apresentada na figura 3.⁴

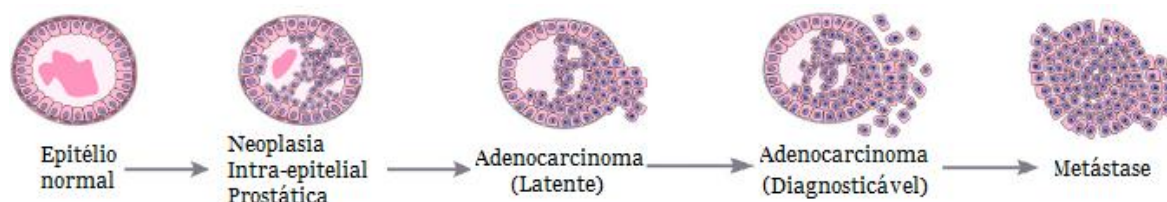


Figura 3- Representação dos processos de iniciação e progressão do cancro da próstata (Adaptado de Chan *et al.*⁴)

Apesar de existirem quatro estadios de CPr, a maioria dos casos diagnosticados encontra-se nos estadios de neoplasia Intra-epitelial prostática (NIP) e de Adenocarcinoma latente (Al), sendo que nestes casos a lesão neoplásica está confinada sob a camada basal da próstata. Na passagem entre Al e adenocarcinoma diagnosticável (Ad), verifica-se a produção e secreção de enzimas da família das metaloproteinases de matriz (MPM), enzimas que vão degradar as proteínas que compõem a membrana basal e possibilitam o desenvolvimento da neoplasia para além dos anteriores limites estabelecidos.^{4,12} Só mais tarde, através do ganho de capacidades de desenvolverem-se independentemente da ação dos androgénios (a partir de Ad) e da sobrevivência sem adesão fora do tecido original é

que as células ganham a capacidade de atingir o último e mais devastador estágio do cancro, a formação de metástases.^{4,11}

Todas as etapas anteriormente referidas no CPR estão compreendidas no contexto dos *Hallmarks* do cancro, ¹³ apresentados na figura 4. Estes consistem na aquisição de 6 capacidades que vão sustentar quer o crescimento tumoral, quer a disseminação de metástases. Neste sentido, vão-se encontrar incluídas a sinalização indutora de proliferação celular, evasão a supressores de crescimento, ganho de capacidade metastática, imortalização celular, indução de angiogénese e mecanismos de resistência à morte celular.¹³ Os hallmarks estão inter-relacionados com alterações metabólicas e de alguns pontos das vias de sinalização celular envolvidas na carcinogénese.

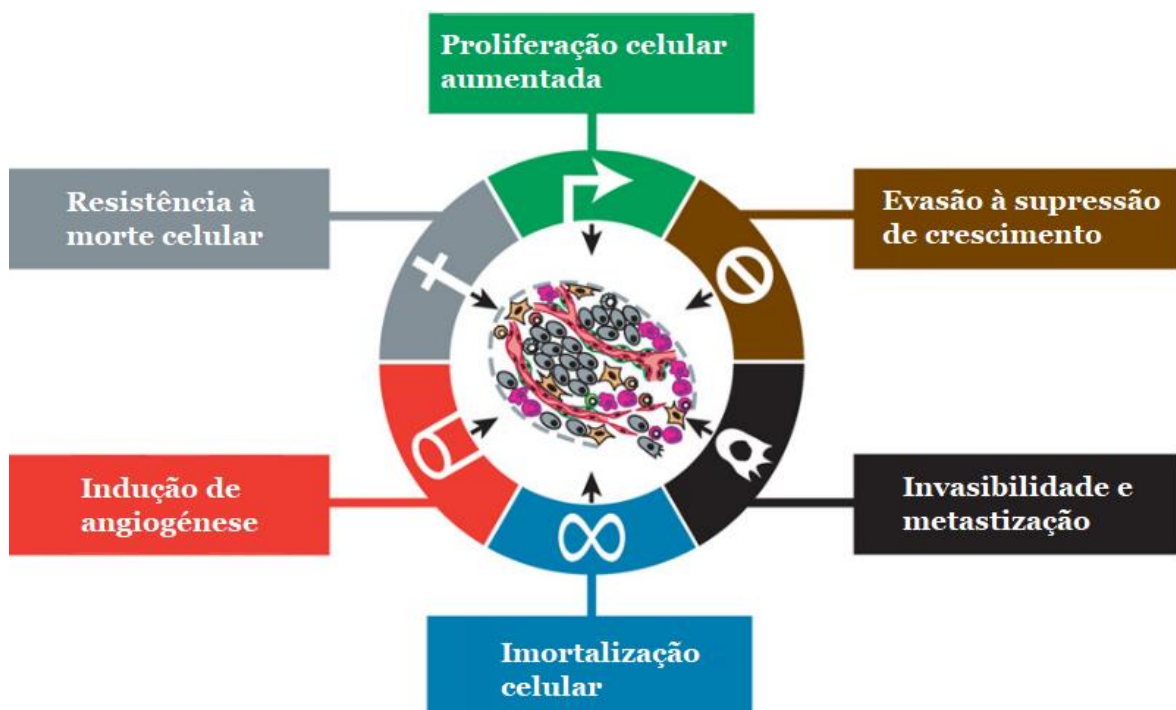


Figura 4- Representação dos 6 principais *hallmarks* do cancro. Adaptado de D. Hanahan *et al.*¹³

1.2.1 Alterações metabólicas no cancro da próstata

Duas das principais disfunções metabólicas encontradas no CPR são as alterações no metabolismo dos vários substratos energéticos e a influência da ação androgénica nos ciclos de vida celulares, sendo que estes fatores encontram-se interrelacionados através de alguns pontos das vias de sinalização celulares, como estará apresentado:

1.2.1.1 Disfunções no metabolismo energético

Em condições normais, as células da próstata possuem por si próprias um metabolismo único, uma vez que uma das suas funções primordiais passa pela produção de secreções com alto teor de citrato. Neste sentido, o ciclo de Krebs encontra-se menos ativo, enquanto outras vias catabólicas alternativas estão mais ativas do que seria de esperar noutros tecidos saudáveis, como é o caso da glicólise e da β -oxidação.^{8,9} Na figura 5, encontram-se representadas as mudanças sofridas pelas células da próstata desde o seu estadio normal até às metástases resistentes à castração.^{8,9}

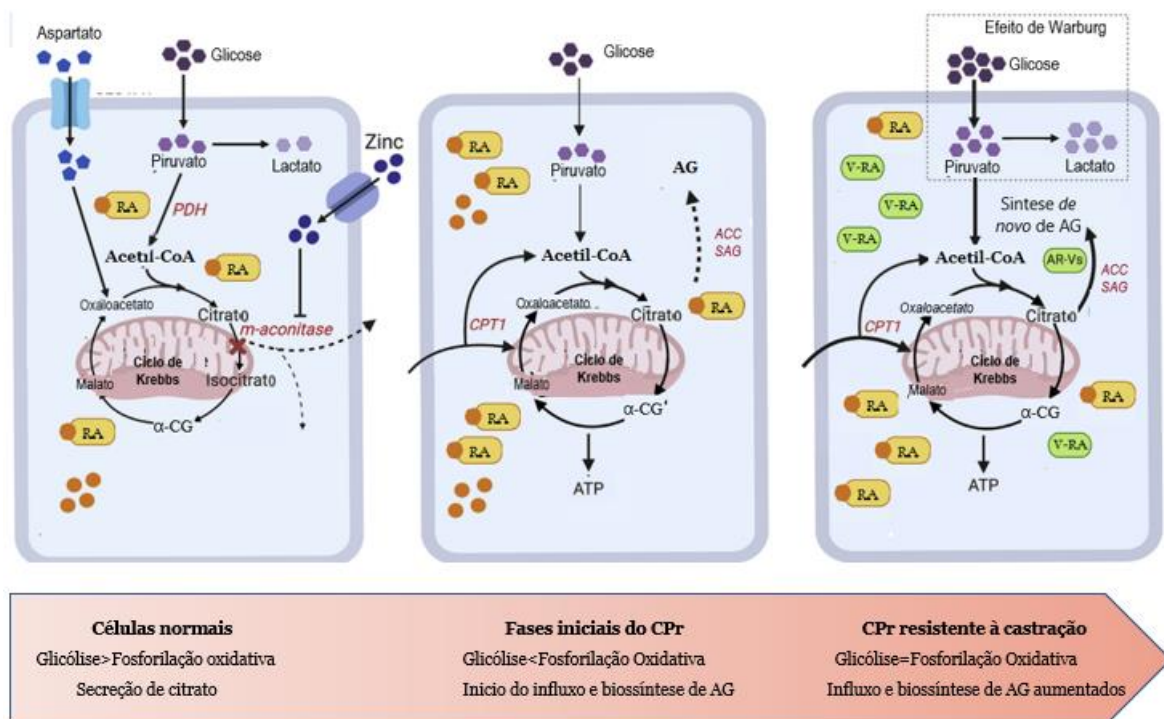


Figura 5- Evolução dos metabolismos energéticos de acordo com a iniciação e progressão tumorais. (Adaptado de C. Mah *et al.*⁹) ACC: Acetil-CoA Carboxilase; α -CG: α -cetoglutarato; V-RA: Variantes de RA; SAG: Síntese de AG

A diferença de metabolismo dos substratos energéticos, entre as células secretoras da próstata e as células normais de outros tecidos, torna-as parcialmente semelhantes ao que tem sido descrito em neoplasias de outros tecidos, tendo a particularidade de se agravar com a progressão entre estadios do cancro, sendo este o motivo por detrás da grande agressividade do CPR.^{6,8}

Anteriormente, foi já referida a importância das alterações do metabolismo energético no decorrer da evolução entre estadios do CPR, sendo estas alterações notórias no que diz respeito ao metabolismo dos principais substratos energéticos: a glicose, a glutamina e ácidos gordos (AG).^{6,8}

No que diz respeito ao metabolismo da glicose, verifica-se que, nas células normais da próstata, o rácio glicólise/oxidação fosforilativa é favorável à via glicolítica (para produção de energia), sendo que a via oxidativa vai ser extensamente inibida pela intervenção do zinco (inibição da m-aconitase), o que, por sua vez, vai fomentar a acumulação de citrato, visando a posterior secreção.^{6,8}

Na iniciação e fase inicial da progressão tumorais, verifica-se a predominância praticamente absoluta do catabolismo da glicose através ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa da glicose, em detrimento da glicólise. Neste caso, vai suprir as necessidades energéticas do ritmo acelerado a que se dá o crescimento tumoral e simultaneamente, a produção de substratos para o anabolismo (através do ciclo de krebs), proporcionando as biomoléculas necessárias a uma proliferação celular acentuada. Numa terceira fase, a taxa glicolítica equipara-se ao ritmo de fosforilação oxidativa, sendo que a glicose é unicamente utilizada como substrato energético no primeiro processo, o que provoca um aumento substancial do lactato. Por outro lado, no que diz respeito à via oxidativa, esta estará vocacionada para o processo de síntese *de novo* de AG, através da carboxilação da acetil-CoA a malonil-CoA, por parte da ACC. O malonil-CoA será substrato da sintase de AG (SAG), contribuindo, desta forma, para a mudança do metabolismo lipídico. Posteriormente, como reflexo do crescimento da massa tumoral, há o favorecimento do efeito de Warburg.^{8,9} Este, consiste na intensificação da glicólise, quer na presença de oxigénio, quer em condições de hipóxia, visando o aumento da velocidade de produção de ATP, em detrimento da quantidade conferida pelo ciclo de *Krebs*. Por outro lado, o efeito de Warburg leva ainda ao fomento da produção de precursores das vias biossintéticas (via das pentoses-fosfato e síntese *de novo* de AG), à produção de NADPH e glutathiona como agentes redutores e conseqüentemente de destoxificadores de espécies reativas de oxigénio.⁹

Quanto ao metabolismo da glutamina, por ser um composto muito abundante em circulação, este tem um grande peso no desenvolvimento de neoplasias. No caso do CPR, devido a uma maior expressão da isoforma 1 da glutaminase e também de algumas isoformas de transportadores membranares, o catabolismo e captação da glutamina estão aumentados. Isto está intimamente relacionado com a progressão do CPR, aumentado não só a viabilidade, como a taxa de crescimento e a invasibilidade.⁸

Como anteriormente referido, as disfunções de metabolismo dos demais substratos energéticos vão culminar nas disfunções do metabolismo lipídico, não só para a colmatação das necessidades energéticas, como também, contribuindo para criação de um perfil anabólico dos AG distinto do que é normal nos tecidos prostáticos.^{8,14} Além disso, verifica-se que os adipócitos adjacentes poderão contribuir para a desregulação do

metabolismo lipídico nas células da próstata.¹⁰ Assim, no âmbito do metabolismo lipídico, tudo aponta que os 4 processos principais sejam: o aumento desregulado do influxo de AG mediado por transportadores transmembranares; o aumento da síntese *de novo*; o armazenamento intracelular de AG associados a lípidos mais complexos (ceramidas, fosfolípidos);^{6,7,15} e o aumento da β -oxidação devido a um aumento de atividade/ expressão de proteínas, especialmente a carnitina palmitoil transferase 1A (CPT1A),⁸ uma vez que a assimilação de AG para o interior da mitocôndria, mediada por esta proteína transportadora, é o passo limitante da β -oxidação. No entanto, existe ainda alguma controvérsia relativamente aos efeitos dos lípidos e dos seus metabolitos no cancro, havendo relatos de uma ação favorável aos processos de iniciação e promoção, mas também de uma ação contrária a esses mesmos processos.^{14,16} Não obstante, tem sido unânime que os AG se tratam do substrato energético cujo metabolismo é o mais dependente dos androgénios.⁹

As disfunções metabólicas acima referidas, vão culminar em alterações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Os primeiros, tais como os que regulam a transcrição das proteínas ras em condições normais, favorecem a sobrevivência e proliferação celulares, unicamente quando as vias de sinalização são favoráveis a estes acontecimentos. No entanto, com o aparecimento de mutações não silenciosas, vão ser convertidos a oncogenes, passando a promover a sobrevivência e proliferação celulares constitutivas, isto é, independentes de estímulos.^{17,18} No caso dos genes supressores de tumor, por exemplo o que regula a transcrição da proteína p53, quando estão na sua forma nativa, na presença de condições de hipoxia, os danos do ADN, ou quaisquer outra anomalia no ciclo celular, são responsáveis pela paragem do ciclo celular, indução da reparação do ADN, ou, caso não seja possível a reparação, indução da morte celular por apoptose.¹⁹⁻²¹ Não obstante, em condições em que a sua atividade está alterada, esses genes estão indiciados como sendo responsáveis por conduzirem à proliferação independente de sinalização extracelular e à resistência a sinais pró-apoptóticos.⁸

1.2.1.2 Dependência de androgénios

Os tecidos normais da próstata são conhecidos pelo facto dos seus ciclos de crescimento serem condicionados pelos androgénios, nomeadamente a testosterona e a 5-dihidrotestosterona (DHT). Durante a iniciação, progressão e metastização do CPR verifica-se que esta dependência dos androgénios é mantida numa primeira fase, levando posteriormente à resistência à castração através de diversos processos.²²

Durante a primeira fase, que compreende a iniciação até à promoção tumorais, verifica-se uma responsividade relativamente normal das células da próstata à presença de

androgénios. A responsividade a androgénios consiste na formação do complexo androgénio-recetor de androgénios (CAR), que, por sua vez, se vai deslocar até ao núcleo celular, regulando a transcrição de genes envolvidos no metabolismo energético, anabolismo das macromoléculas e no ciclo celular em geral. A partir do momento em que se dá a iniciação tumoral, começam-se a verificar mutações que levam à mudança de comportamento da célula relativamente ao estímulo provocado pela criação do CAR e subsequente translocação até ao núcleo, verificando-se o aumento da expressão dos genes envolvidos na mitose, havendo simultaneamente a inativação dos checkpoints de controlo da fase mitótica.²²

Numa fase posterior, verifica-se então a “independência de androgénios”, também denominada como resistência à castração. Isto ocorre, primeiramente, devido ao acumular de mutações e, depois, devido a mutações que passam a revelar-se mais significativas (isto é, que impliquem ganho/perda de função), interferindo desta forma ainda mais no desenvolvimento e metabolismo prostáticos. Um desses processos leva a que as células tumorais protáticas produzam os próprios androgénios, ocorrendo uma ação autócrina e parácrina. Desta forma, as células estimulam-se a si próprias, assim como ao restante tecido adjacente. Em segundo lugar, ocorrem mutações pontuais nos RA, que vão culminar na maior parte das vias de resistência à castração. Por exemplo, as mutações T887A, W741C e F876L levam à perda de responsividade dos RA aos seus antagonistas, ou mesmo à conversão da atividade de antagonismo dos compostos em agonismo.⁶

Outras mutações, tais como as que acontecem na linha celular AIPC, levam a que não haja sequer a necessidade da presença de androgénios para que as células proliferem. Isto é provocado pela perda de seletividade/especificidade dos RA pelos seus ligandos habituais, passando a responder positivamente a qualquer molécula de natureza esteróide, nomeadamente estrogénios, progesterona, glucocorticóides e moléculas afins.⁶

Por fim, é necessário considerar a relação entre as disfunções do RA e as metabolismo dos diversos substratos energéticos. Neste sentido, diversos trabalhos demonstram que estas disfunções derivam, em primeiro lugar, das anomalias de funcionamento do CAR, que vão levar à convergência dos diversos metabolismos, por forma a favorecer o metabolismo lipídico, que subsequentemente vai proporcionar vantagens ao desenvolvimento de tumores.⁹ Sequencialmente, verifica-se um direcionamento para que todos os substratos energéticos levem à produção de AG (síntese *de novo*). Estes serão armazenados nos corpos lipídicos das células e alimentam a β -oxidação, induzindo ainda a transcrição de transportadores de ácidos gordos exógenos, quer os que se encontram na forma livre, quer os provenientes de lipoproteínas VLDL e LDL e HDL. Um desses transportadores é o cluster de diferenciação 36 (CD36), que será o tema do próximo tópico. Os eventos

anteriormente retratados encontram-se representados na figura 6, onde estarão também os respectivos intervenientes.

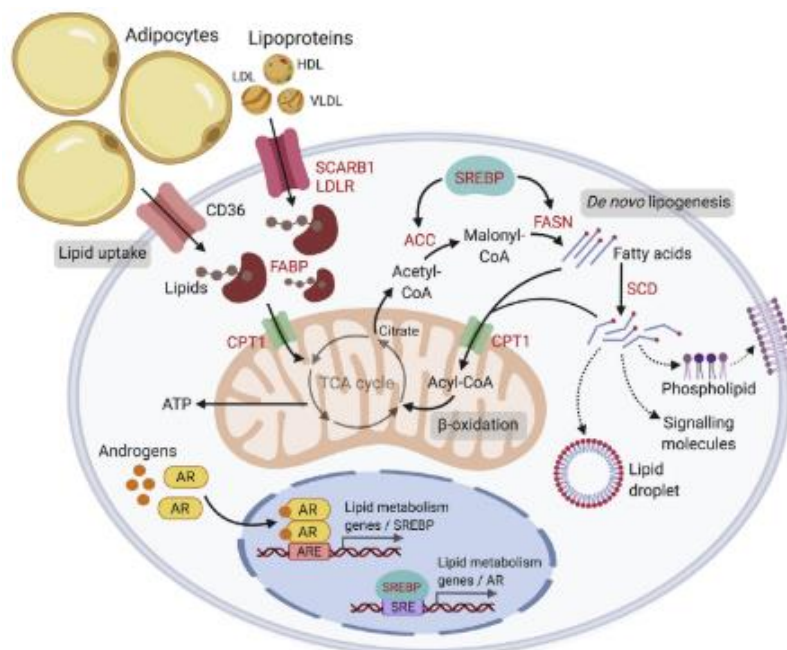


Figura 6- Representação das interações estabelecidas entre adipócitos extracelulares, transportadores de AG, dependência de androgénios, expressão génica e metabolismo lipídico. Adaptado de Mah, C *et al.*⁹

1.3 CD36

1.3.1 Características gerais

O CD36, é um recetor transmembranar sequestrador/captador que está envolvido no influxo de lípidos (AG, fosfolípidos e colesterol) através da membrana celular^{23,24} e de organelos membranares¹⁵ (mitocôndria e corpos lipídicos). Para além disso, leva ao desencadeamento de diversas vias de sinalização intracelular no reconhecimento antigénico, inflamação, adesão celular e apoptose.^{15,24} Desta forma, o CD36 vai ter diversos papéis na homeostase, ou na perda desta.^{15,24} A transcrição do CD36 é controlada por 2 fatores de transcrição principais, o CCAAT/*enhancer-binding protein* α (C/EBP- α) e o recetor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR- γ , do inglês peroxisome proliferator-activated receptor gamma).²⁵

Relativamente à sua estrutura, o CD36 é uma proteína com um peso molecular de 53 KDa,¹⁵ possuindo uma porção extracelular de 47 kDa, onde se encontram as 2 entradas que convergem para um único canal hidrofóbico. Este, atravessa transversalmente a sua

porção intra-membranar e permite tanto a catálise, quanto o transporte de AG através dela,²³ tal como representado na figura 7A.

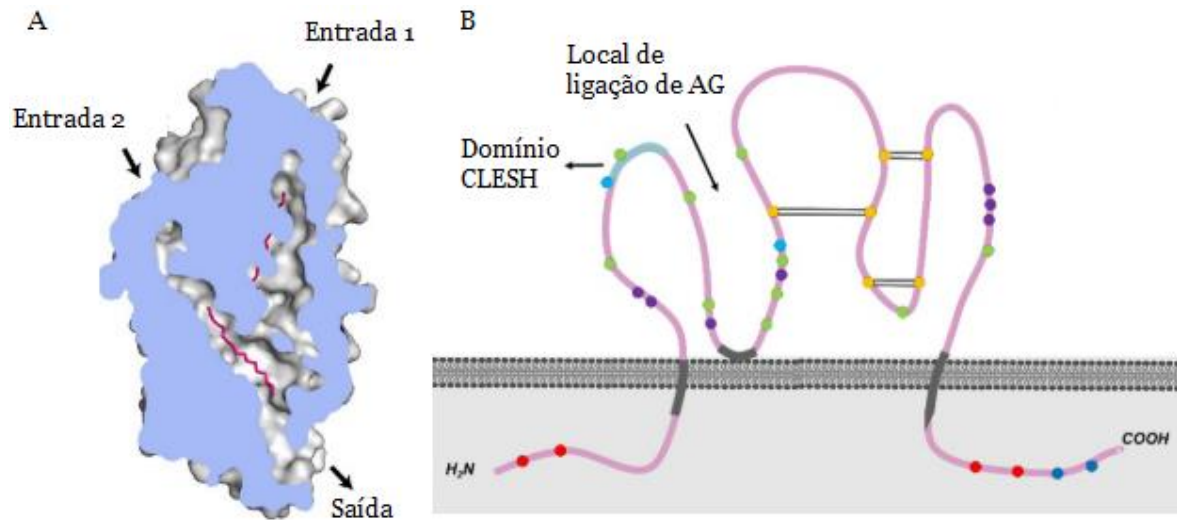


Figura 7- Modelos estruturais do CD36: (A) estrutura cristalina, adaptado de Hsieh, F. *et al*; ²³ (B) modelo com locais de ligação, alguns ligandos, modificações pós traducionais, adaptado de W. Jingchun. ²⁶

Verifica-se que entrada 1 (figura 6A) está envolvida na atividade de translocase de AG, sendo ainda um local de interação da molécula para com outras macromoléculas, necessário para se estabelecerem essas interações.²³

Segundo outro modelo, apresentado na figura 6B, a molécula CD36 está descrita unicamente como tratando-se de um recetor que medeia a entrada de AG por endocitose, ao invés de funcionar ela própria como um transportador. Por outro lado, é ainda descrita como mediadora de uma série de vias sinalizadoras através de tirosina cinases associadas aos terminais carboxilo e amina.²⁶

O CD36 apresenta uma expressão em várias membranas, desde a membrana celular até à membrana externa da mitocôndria, tendo um papel bastante importante no influxo de AG para a célula e na sua captação e catabolismo mitocondrial (β -oxidação).¹⁵

1.3.2 Envolvimento do CD36 no cancro da próstata

Nos tecidos tumorais, o CD36 é expresso ao nível de todas as células inseridas na massa tumoral, incluindo as células imunológicas. A expressão deste recetor vai aumentando desde o estadio de iniciação até atingir o seu auge aquando da metastização, sendo visto como um potencial biomarcador e alvo terapêutico para o cancro.¹⁵

Foram relatadas evidências sobre a correlação entre a presença de AG provenientes de adipócitos próximos ao tumor e uma maior taxa de iniciação e progressão tumorais. Este facto é relevante no contexto do cancro da próstata, visto que este órgão está envolvido por tecido adiposo, principalmente na população mais envelhecida, que é a mais atingida por esta patologia. Por outro lado, verifica-se que os AG são o substrato energético preferencial de células tumorais da próstata,⁶ o que pode estar relacionado com o facto das proteínas de transporte e metabolização, em que o CD36 está inserido, estarem sobreexpressas nas células tumorais e nos adipócitos adjacentes. Neste contexto, pesquisas recentes indicam o “eixo” CD36/Stat3/Nf-Kb como sendo uma das via de sinalização celular responsável pela carcinogénese derivada da desregulação do CD36.⁷

O facto do CD36 reconhecer ligandos que não sejam apenas AG, mas também outros ligandos lipídicos e lipoproteínas alteradas devido a oxidação, ionização e outros fenómenos de stress, vão levar à ativação das Src cinases, que estão envolvidas em processos de angiogénese e inflamação, pelo que podem contribuir desta forma na progressão tumoral.⁷

Tal como nos restantes tipos de cancro, também nos tecidos da próstata foi verificado o aumento dos três processos característicos da alteração do metabolismo lipídico acima descritos, além da expressão elevada de CD36 ser favorável à sua metastização em diversos tecidos.^{7,15}

1.3.3 CD36 como alvo terapêutico

A ação terapêutica sobre o CD36 pode passar quer pela inibição da sua ação de forma direta, pela regulação das suas modificações pós traducionais, como pela regulação da sua transcrição.²⁴

Relativamente à inibição direta do CD36, verifica-se que esta proteína é passível de ser inibida irreversivelmente por ésteres de *N*-hidroxissuccinimida funcionalizados com AG, classe de pró-fármacos onde está incluído o SSO (figura 7), uma vez que podem reagir com as aminas dos grupos laterais de resíduos lisina, inibindo covalentemente a enzima. Neste

contexto, ocorre uma substituição nucleofílica iniciando-se com o ataque da amina ao carbonilo da ligação éster, com formação de uma ligação amida entre a cadeia carbonada do AG e a lisina 164 do CD36 (figura 8). Foi também demonstrado que as consequências metabólicas eram unicamente resultado da inibição direta do CD36 e não por interferência na transcrição ou tradução do gene.²⁴

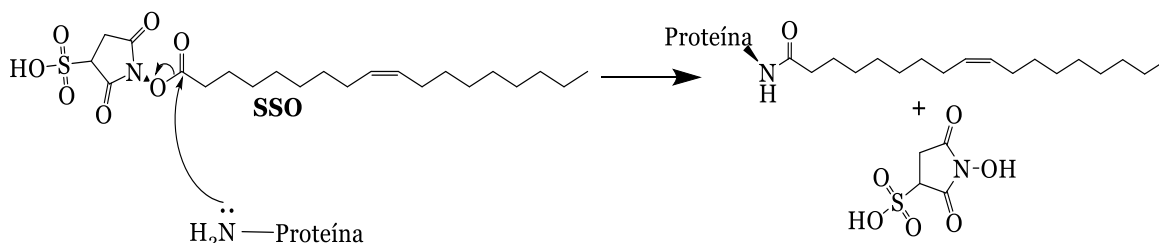


Figura 8-Mecanismo de inibição irreversível do CD36 por parte do SSO através da formação de uma ligação covalente amida entre o resíduo de lisina 164 e a cadeia carbonada do SSO.

Além da inibição irreversível do CD36, verificada no caso anterior, Alain Geloën *et al.*²⁷ estudaram 3 hidrazonas (figura 8) como potenciais inibidores reversíveis. Dois delas, conseguiram promover uma inibição competitiva reversível, com resultados mais promissores que o SSO, tendo sido determinados IC_{50} de 0,1 μ M e 0,5 μ M para o AP5055 e AP5258, respectivamente, contra os 25 μ M para o SSO. Curiosamente, o composto AP5156 não apresentou qualquer atividade inibitória, aparentando inclusivamente uma atividade agonista.²⁷

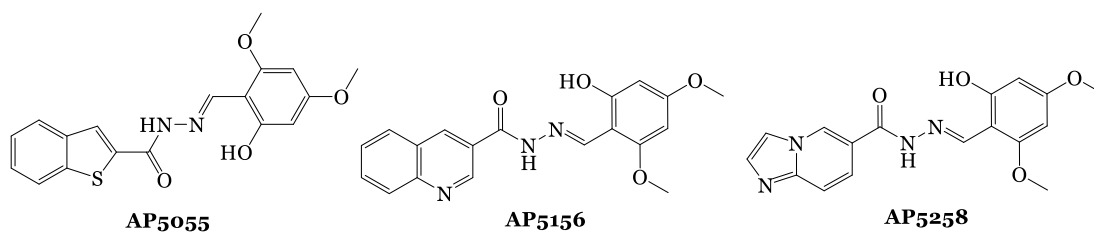


Figura 9 Representação estrutural das hidrazonas estudadas por A.Geloën *et al.* como potenciais inibidores reversíveis do CD36.²⁶

Relativamente às moléculas apresentadas como tendo atividade inibitória sobre o CD36 no contexto tumoral, apenas os análogos de TSP-1 e combinações de anticorpos anti-CD36 se encontram em ensaios pré-clínicos. Estes compostos ligam-se ao domínio CLESH do CD36, reduzindo a mobilização de proteínas src relacionadas com a metastização.¹⁵ No entanto, verifica-se que a actividade anti-ploferativa através da inibição direta do CD36 necessita de uma inibição praticamente total, comparável ao silenciamento da proteína, ou da utilização de anticorpos que bloqueiem a sua função.^{28,29}

Quanto à inibição das modificações pós-traducionais (Figura 10), verifica-se que a acetilação da lisina 164, responsável pela interação com os substratos (AG), vai resultar na inibição indireta do CD36, independentemente da sua expressão.¹⁵

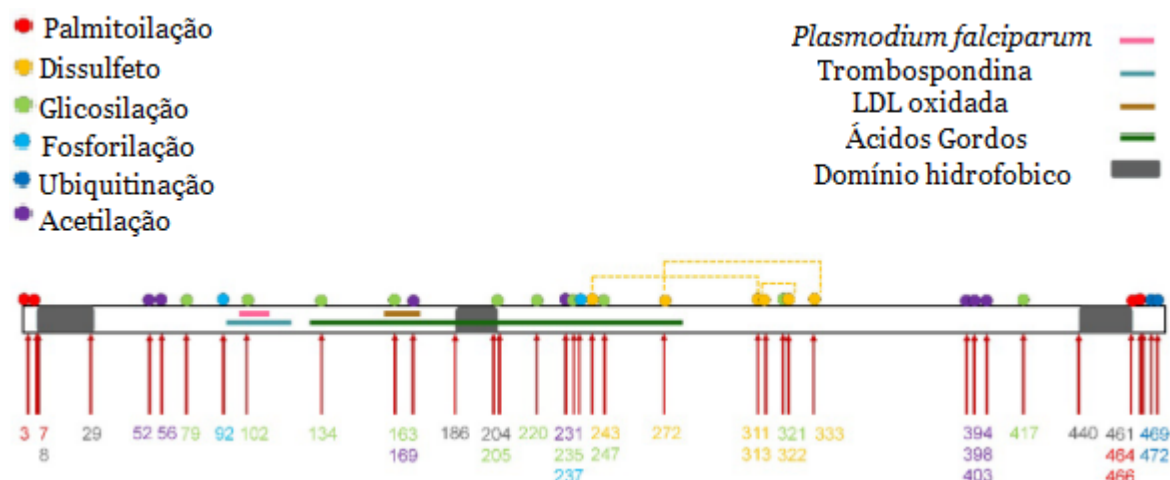


Figura 10- Estrutura secundária do CD36, ligandos e modificações pós traducionais passíveis de serem alvos terapêuticos indiretos.¹⁵

O nível de glicosilação, que é diretamente proporcional à presença do CD36 na membrana celular, poderia ser eventualmente também tido em conta nas terapias. No entanto, uma vez que é um tipo de modificação pós-transcricional pouco específica, não há qualquer fármaco que vise este alvo. A palmitoilação do CD36 é responsável pela ancoragem desta proteína às membranas, regulando assim o transporte intracelular e a associação do CD36 às membranas celulares, sendo que a ausência parcial/total mostrou inibir o influxo de AG, assim como processos inflamatórios relacionados com esta proteína.^{15,30}

O nível de acetilação é particularmente interessante pelo facto de ser apresentado como sendo inversamente proporcional à atividade do CD36, estando documentada a inibição indireta desta proteína através da inibição de desacetilases responsáveis pela ativação do CD36, pela remoção de grupos acetilo que se encontram ligados às lisinas e ainda pelo papel na regulação da expressão proteica e genética ¹⁵

1.4 AG e seus derivados

1.4.1 Características gerais

Os AG são um tipo particular de ácido carboxílico que possuem uma cadeia carbonada, mais ou menos longa, que normalmente compreende entre 4 e 28 átomos de carbono.³¹ Geralmente, os AG estão divididos em três categorias, consoante o tamanho da sua cadeia: os que têm menos de 5 carbonos são chamados de AG de cadeia curta (AGCC); os que têm uma cadeia entre 6 e 12 carbonos são considerados AG de cadeia média (AGCM); os que contenham entre 13 e 21 carbonos tratam-se de AG de cadeia longa (AGCL); e os que excedem os 22 carbonos são AG de cadeia muito longa (AGCML).³¹ Esta classificação foi atribuída não só pelo comprimento da cadeia carbonada, mas também por possuírem propriedades e funções distintas nas células. No que diz respeito aos AGCC e AGCM, estes normalmente são mais vocacionados para a produção de energia, ou para conversão em AG mais longos. Quanto aos AGCL e AGCML, que poderão ter também uma ou mais insaturações, possuem um papel mais importante ao nível de diversas vias de sinalização celulares, tendo papéis cruciais em processos tais como a regulação da inflamação, proliferação celular e angiogénese.³¹

Do ponto de vista bioquímico, estes compostos são derivados de triacilglicéridos ou fosfolípidos e participam numa vasta gama de processos biológicos. Estes constituem uma importante fonte de energia, assim como são necessários para a síntese de novos constituintes celulares importantes a nível estrutural ou que participam direta ou indiretamente numa das vias de sinalização celular.²⁸

Diversos AG, principalmente de cadeias com uma ou mais insaturações, têm sido relatados como tendo propriedades preventivas e/ou terapêuticas para diversas patologias. Tal facto deve-se às propriedades regulatórias sobre os níveis plasmáticos de alguns compostos, que em determinadas concentrações, poderiam ser considerados fatores de risco.^{16,31-33} Nesse sentido, tem sido desenvolvido trabalho com resultados bastante promissores na utilização de AG e compostos híbridos de AG no que diz respeito à atividade antiproliferativa, tendo sido avaliado o seu efeito em várias linhas tumorais abrangendo diversos tecidos.³¹

A hibridização molecular, que visa a combinação de dois ou mais farmacóforos com o intuito de obter uma molécula que contenha as propriedades estruturais e biológicas melhoradas comparativamente às moléculas que lhes deram origem.³⁴⁻³⁶ Neste contexto, a funcionalização de compostos com diversos AG tem-se revelado interessante, uma vez que pode permitir alterar favoravelmente parâmetros como a biodisponibilidade, afinidade

para diversos recetores e ainda reduzir a toxicidade que esses mesmos compostos muitas vezes têm na forma não funcionalizada.^{31,37}

As hibridações de AG com outros compostos através de ligações éster ou amida, são as que têm sido descritas mais frequentemente. Estes híbridos têm revelado atividades muito diversas, desde antibacterianas, a anti-inflamatórias e anti-proliferativas, sendo que, no que diz respeito à citotoxicidade e seletividade, parecem aumentar com o tamanho da cadeia, embora alguns compostos não obedeçam a essa relação EA.^{34,35,38,39} Verifica-se ainda a possibilidade de realizar a hibridação com o objetivo de dar origem a pró-farmacos, através de ligações éster, amidas, hidrazonas e dissulfetos com o intuito de que enzimas presentes no microambiente tumoral promovam a sua cisão e consequente libertação do fármaco diretamente no tumor. ⁴⁰ Essa vantagem, no contexto dos pró-farmacos poderá ser uma desvantagem, no que diz respeito a moléculas que se queiram utilizar como fármacos, já que se estas moléculas ao degradarem as ligações antes de qualquer interação com o alvo terapeutico, não poderão exercer o efeito pretendido.

1.5 Ácidos (tio)barbitúricos e seus derivados

Os derivados de ácidos barbitúricos e tiobarbitúricos, aqui designados de (tio)barbitúricos (figura 10), possuem uma vasta gama de atividades biológicas, tais como ação bactericida, inibição da angiogénese, ação anti-inflamatória, modulação da resposta imunitária, ação inibitória de diversas enzimas, ação anticancerígena, entre outras. Cada uma destas atividades está intimamente relacionada com diferentes funcionalizações, principalmente ao nível dos seus azotos, nas posições 1 e 3, e ao nível do carbono 5 (C5). Destas, a funcionalização ao nível do C5 é aquela que foi caracterizada como possuindo o maior peso neste aspeto, particularmente no caso da hibridização com heterociclos, tendo vários compostos destes grupos capacidade antiproliferativa, principalmente no caso dos tiobarbitúricos, que aparentam ter a sua atividade aumentada relativamente aos seus análogos barbitúricos.^{41,42,43}

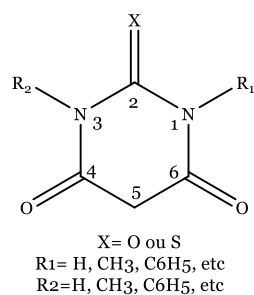
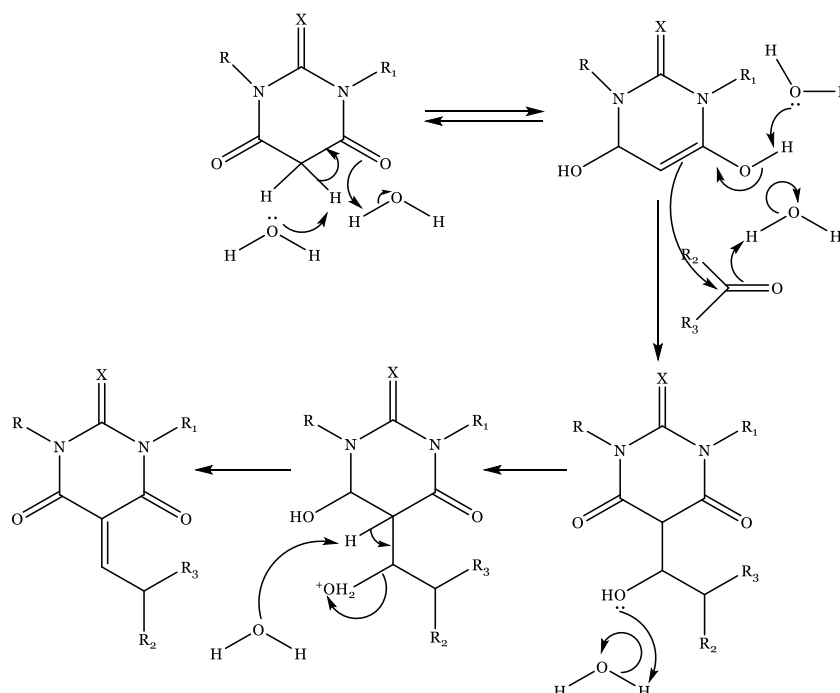


Figura 11- Representação da estrutura geral dos (tio)barbitúricos e respectiva numeração.

A síntese dos conjugados de ácidos (tio)barbitúricos referidos anteriormente, assenta principalmente na reação de condensação de Knoevenagel, em que a presença de possibilidade de tautomerismo ceto-enólico vai levar a que o núcleo barbitúrico aja como um nucleófilo, atacando diretamente aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos, por forma a originar os conjugados resultantes.^{43,44} No esquema 1, encontra-se representado um exemplo deste tipo de reação envolvendo o ácido barbitúrico e um outro reagente, que poderá ser um aldeído, cetona ou ácido carboxílico, dependendo dos grupos substituintes R_2 e R_3 . B. Dhorajiya *et al.*,⁴⁵ reportam este tipo de reação em meio aquoso, uma vez que esta pode comportar-se como um solvente anfotérico. Não obstante, há também referência para a possibilidade de serem utilizados catalisadores, tais como a dicitloexilcarbodiimida (DCC) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) para o caso do acoplamento com ácidos carboxílicos, num meio anidro.⁴⁵⁻⁴⁸



Esquema 1 - Mecanismo geral das reações de condensação de *Knoevenagel*, em meio aquoso, possibilitando a funcionalização de (tio)barbitúricos no carbono 5. Adaptado de B. Dhorajiya *et al.*⁴⁵

Em termos de relação estrutura-atividade dos derivados de (tio)barbitúricos, verificou-se um potencial inibitório sobre diversas enzimas, algumas das quais desempenham um dado papel na carcinogênese. Destas, salientam-se as metaloproteínas de matriz (MPM) 2 e 9, proteases que degradam proteínas da matriz extracelular, como o colagénio IV.⁴³ Tendo em vista a inibição das MPM 2 e 9, verificou-se que diversas funcionalizações de (tio)barbitúricos no carbono 5 tem diferentes influências (figura 10).⁴³

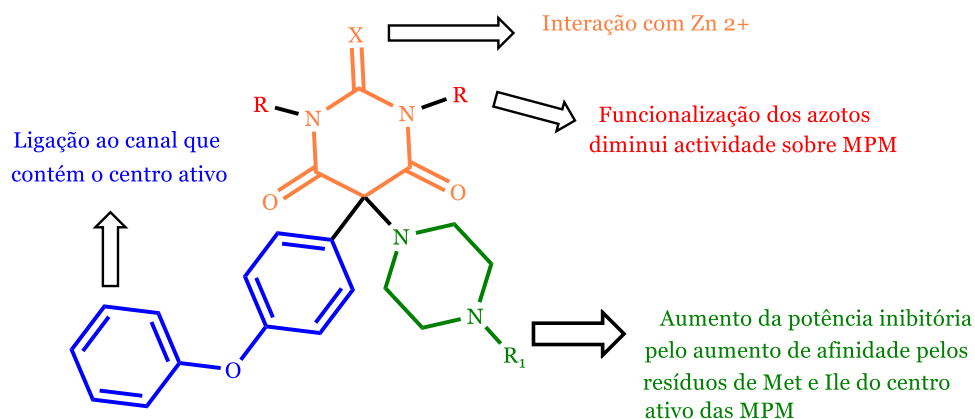


Figura 12- Influência da funcionalização dos (tio)barbitúricos ao nível dos azotos 1 e 3 e carbono 5 na sua atividade inibitória sobre as MPM.⁴³

No caso da adição do anel de piperidina (figura 12, verde), verifica-se o aumento da potência inibitória para com estas enzimas, especialmente quando o R₁ representa um grupo substituinte hidrofóbico. Adicionalmente, a existência de uma dupla funcionalização ao nível do carbono 5, incluindo um grupo hidroxilo, ao invés da piperidina referida anteriormente, vai melhorar o perfil farmacocinético do barbitúrico em questão. Por outro lado, a presença de um grupo nitroso, que se vai libertando na presença destas enzimas, vai proporcionar uma inibição de diversas vias de sinalização associadas com o cancro, nomeadamente as relacionadas com as interleucinas (IL) 2, 1β e 8, com o fator nuclear kappa B (FN-kB) e com o fator de necrose tumoral alfa (FNT-α). Porém, a substituição da piperidina por um grupo hidroxilo ou nitroso limita o potencial inibitório sobre as MPM's, já que, como representado na figura anterior, o grupo piperidina é capaz de aumentar a eficácia sobre essas enzimas.⁴³

Por outro lado, a funcionalização do carbono 5 com bases azotadas (especialmente a citosina), ou outro grupo heterocíclico contendo azoto, vai ter efeitos protetivos nas células normais, provendo aos (tio)barbitúricos uma maior citotoxicidade nas células tumorais. Este efeito é visualizado especialmente nos ácidos tiobarbitúricos.⁴³ Tais influências da estrutura desses derivados de (tio)barbitúricos encontram-se representados na figura 11.

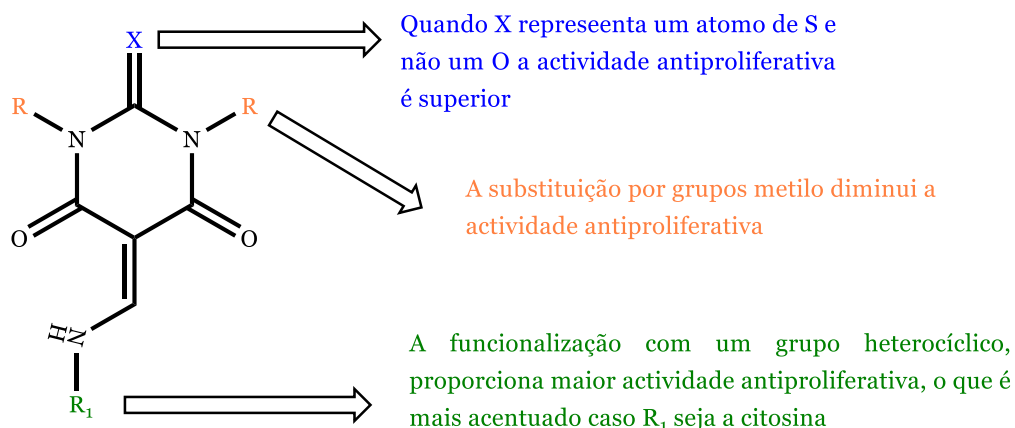


Figura 11- Influência da adição de grupos (bi)cíclicos constituídos por 1 ou mais átomos de azoto na atividade anti proliferativa.⁴³

Já a funcionalização dos (tio)barbitúricos com um grupo indole em C5 (figura 12) fornece capacidade inibitória sobre as enzimas ribonuclease redutase e timidilato sintase, associadas à proliferação e metástase das células neoplásicas. Neste caso, os derivados de tiobarbitúricos possuem mais atividade inibitória sobre estas enzimas que os ácidos barbitúricos homólogos.⁴³

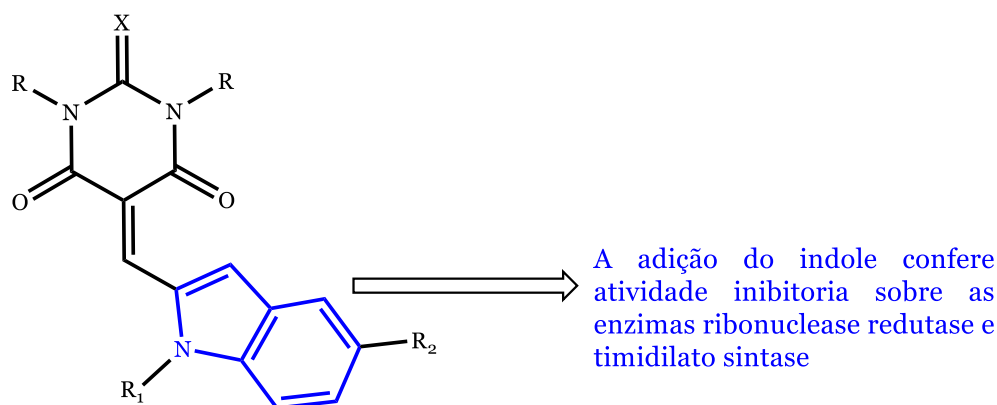


Figura 13- Influência da adição de um grupo indole (bi)substituído em C5 na inibição das enzimas ribonuclease redutase e timidilato sintase.⁴³

A funcionalização do carbono 5 de (tio)barbitúricos com grupos hidrofóbicos favorece a atividade inibitória sobre as sirtuínas, enquanto grupos hidrofílicos fazem com que haja perda desta atividade, figura 13.⁴³ Tal atividade poderia ser interessante explorar no contexto do CD36,¹⁵ uma vez que as sirtuínas são enzimas cuja atividade passa pela clivagem de grupos acetil ligados a resíduos de lisina em diversas proteínas^{43,49} e está descrito que o elevado nível de acetilação das lisinas do CD36 contribui para a sua perda da atividade de translocase.¹⁵

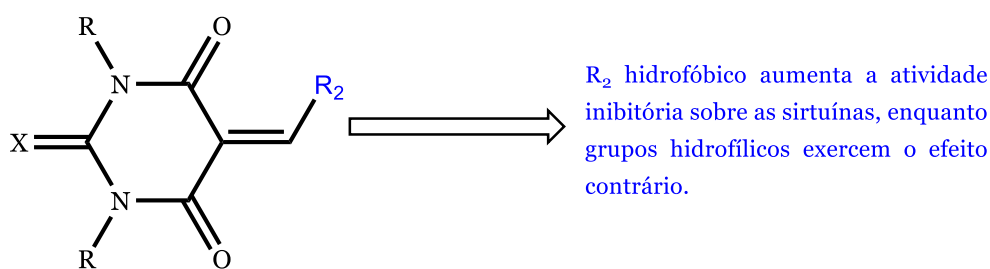


Figura 14- Influência da polaridade do grupo R₂ na atividade inibitória sobre as sirtuínas.

2. Objetivos

O CD36 é uma glicoproteína que se encontra sobre-expressa CPR, sendo referido em diversas pesquisas como um biomarcador e alvo terapêutico, seja pela sua inibição direta ou indireta. Neste sentido, pretende-se aproveitar propriedades de compostos funcionalizados com AG e de ácidos barbitúricos funcionalizados em C5 já descritas em algumas doenças relacionadas com as vias de sinalização desencadeadas pelo CD36 e avaliar a sensibilidade das linhas celulares LNCaP, PC3 e PNT1A aos compostos sintetizados. Assim, este trabalho propõe-se a materializar os seguintes objetivos:

- 2.1.-Desenvolvimento de potenciais futuros fármacos anti-tumorais através da hibridização dos ácidos (tio)barbitúricos e AG, passando pelo *design*, síntese, purificação e caracterização estrutural destes compostos.
- 2.2. Avaliação e descrição das suas atividades biológicas, nomeadamente dos seus potenciais anti-proliferativo (através de MTT) e inibitório do CD36 (utilizando a metodologia associada ao Bodipy-C16 e Hoescht) nas diversas linhas celulares usadas para este efeito, assim como avaliação da seletividade das suas atividades para linhas tumorais vs linha PNT1A (não-tumoral).
- 2.3. Elaboração de estudos computacionais de docking molecular (usando o software *Autodock Vina*), assim como a simulação das propriedades farmacocinéticas mais relevantes (perfil ADMET) e de *druglikeness*, através das ferramentas facultadas nos endereços eletrónicos das ferramentas *online pkSCM* e *SwissADME*
- 2.4. Estabelecimento de relação entre os dados provenientes dos estudos computacionais e a atividade biológica.

3. Materiais e Métodos

3.1 Estudos computacionais

3.1.1 *Docking* molecular

A estrutura cristalina da proteína foi acedida e descarregada através da base de dados *Protein Data Bank* (PDB), a partir do endereço <https://www.rcsb.org>, utilizando o código 5LGD. Por forma a validar o método de *docking*, foram utilizados 3 compostos descritos na literatura na qualidade de controlos positivos, concretamente o AP5055,²⁷ o AP5258²⁷ e SSO,²⁶ e ainda o AP5156²⁷ na qualidade de controlo negativo.

3.1.1.1 Preparação da proteína e ligandos

De forma a prepara-se a proteína alvo de *docking*, em primeiro lugar, utilizando o *software Chimera 1.14*, selecionaram-se e eliminaram-se todos os interferentes, nomeadamente a proteína co-cristalizada PfEMP1, o ácido palmítico, a 2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopirranose, o 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol e o glicerol, ficando apenas a proteína CD36. Posteriormente, preparou-se a proteína isolada para o *docking* recorrendo à opção “*dock prep*” e, finalmente, guardou-se em formato “.pdb”. Posto isso, carregou-se o referido ficheiro no *software AutoDockTools 1.5.6* e procedeu-se à sua preparação, removendo as moléculas de água, adicionando os hidrogénios e removendo os não polares, calculando as cargas de Gasteiger e transformando os átomos em formato “AD4”. Por fim guardou-se a proteína em formato “.pdbqt”, de forma a que a proteína e os átomos que a constituem estivessem num formato compatível com a execução de *docking* molecular.

Após o design dos ligandos através do *software ChemDraw 19.1*, partiu-se para a minimização da energia, isto é, o cálculo de estrutura tridimensional dessas moléculas que apresentassem menor energia de Gibbs, e por isso, serão as estruturas mais estáveis e prováveis dos compostos. Assim, recorrendo ao programa Chem3D, através da opção “*perform MMFF94 minimization*” foi obtida a estrutura otimizada para o *docking*. Posto isso, guardou-se em formato “.mol2”. Finalmente, recorrendo ao *software AutoDockTools*

1.5.6 foram retirados hidrogénios não polares e definem-se as ligações rotáveis como *standard*, guardado-se também no formato “.pdbqt”.

3.1.1.2 Docking molecular em Autodock Vina

O docking foi executado inicialmente utilizando uma única *grid*, a menor capaz de conter toda a proteína, mantendo dimensionamento e centro para a execução de todas as simulações efetuadas. Assim, verificou-se que os parâmetros ótimos da *grid* são os que correspondem às dimensões de $x = -66 \text{ \AA}$, $Y = 54 \text{ \AA}$ e $Z = 82 \text{ \AA}$, com um espaçamento de 1 \AA e considerando que o centro da *grid* é comum com o centro da proteína, isto é, em $X = -42$, $Y = -28$ e $Z = 25$. Após esta etapa, criaram-se os ficheiros em bloco de notas, (1 para cada um dos ligando).^{50,51} Nestes ficheiros, foi definido o recetor, o ligando, as coordenadas da *grid* e também o extensão de docking, mais propriamente o número de simulações através do parâmetro *exhaustiveness*, tendo sido definido o valor de 20.

Finalmente, efetuou-se a corrida do *docking* para cada um dos ligandos com recurso à linha de comandos, remetendo sempre ao ficheiro executável do *software* Autodock Vina, ao documento com as definições do *docking* e ainda à criação de um ficheiro de bloco de notas contendo os resultados das energias de ligação para as 10 conformações mais favoráveis às interações proteína-ligando.

3.1.1.3 Representação das interações proteína-ligando

De forma a ser possível a visualização e representação das interações simuladas entre cada uma das moléculas e a proteína foi utilizado o *software* Discovery Studio.⁵² Este programa permite a ilustração bi-e tridimensional das interações que vão ser estabelecidas,⁵² neste caso o CD36. Para isso, após o docking, a conformação mais favorável calculada para cada molécula em estudo foi isolada recorrendo ao *software* PyMOL, por forma a poder posteriormente ser utilizada no *software* Discovery Studio.

3.1.2 Previsão dos perfis farmacocinéticos e de *druglikeness*

Foram realizadas previsões dos perfis farmacocinéticos e de *druglikeness* de todos os compostos em estudo, utilizando para esse efeito os *softwares* pkSCM⁵³ e SwissADME⁵⁴, ambos online e passíveis de serem utilizados através dos endereços eletrónicos <http://biosig.unimelb.edu.au/pkscm/prediction> e <http://www.swissadme.ch>, respetivamente.

Assim, pretendeu-se antever as propriedades farmacocinéticas, expressas através do perfil de absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (perfil ADMET) e *druglikeness* das moléculas em estudo. Este estudo foi efetuado utilizando o sistema de especificação simplificada de entradas moleculares, (SMILES – do inglês, *simplified molecular input line entry specification*), que define a estrutura de cada composto, sendo obtido recorrendo ao *software* ChemDraw 19.1.^{53,54}

3.2 Síntese de ácidos barbitúricos funcionalizados com AG

Ao longo dos trabalhos de síntese, todos os reagentes e solventes foram utilizados sem qualquer purificação adicional, à exceção do diclorometano. Este, foi seco antes de cada reação, usando, para o efeito, um sistema de destilação com ampola de recolha, adicionando-se reguladores de ebulição e pentóxido de fósforo ao balão de destilação que continha o solvente.

Para seguir o progresso das reações foram realizadas cromatografias de camada fina (CCF), onde foram utilizadas placas de alumínio resvestidas por sílica gel (Macherey-Nagel 60/UV₂₅₄). Após a eluição, as placas foram reveladas em câmara de Iodo e visualizadas ao comprimento de onda de 254 nm.

Os pontos de fusão (p.f.) foram determinados em tubos capilares abertos, utilizando um aparelho de pontos de fusão *Büchi B-540* para o efeito.

Para a obtenção dos espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) foi utilizado um espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR. As amostras foram colocadas sobre o cristal, registrando-se o espetro. Como referência foram realizadas leituras sem qualquer componente, funcionando como branco, à temperatura ambiente. Estes espectros foram adquiridos entre 4000 e 600 cm^{-1} por refletância total atenuada (ATR - do inglês, *Attenuated Total Reflectance*), com um 64 *scans* para o *background* e 32 *scans* para cada amostra, com uma resolução de 4 cm^{-1} , sendo tratados através do *software* Omnic 8.2. Os dados obtidos relativos a cada composto analisado foram apresentados na respetiva descrição dos mesmos, indicando-se a frequência máxima da banda de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}).

Os espetros de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (RMN de ^1H) e de Carbono (RMN de ^{13}C) foram adquiridos utilizando um espectrofotómetro *Brüker Avance III 400* MHz, respetivamente a 400,13 e a 100,62 MHz, tendo sido devidamente tratados no

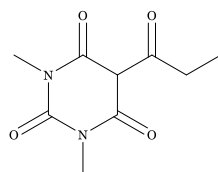
software MestReNova v.14.1.1 *free trial*. Para a realização destes mesmos espectros utilizaram-se o dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- d_6) ou o clorofórmio deuterado (CDCl₃) que funcionaram como solventes e como padrões internos [DMSO- d_6 , desvio químico (δ) = 2,50 partes por milhão (ppm) e 39,52 ppm ou CDCl₃, δ = 7,26 ppm e 77,16 ppm em RMN de ¹H e ¹³C, respetivamente]. Os dados obtidos relativos a cada composto analisado foram apresentados na respetiva descrição dos mesmos, no caso do RMN de ¹H, pela seguinte ordem: solvente; δ em ppm; multiplicidade do sinal [singleto (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), ou multiplete (m)]; constante de acoplamento (J em Hz); atribuição do próton na molécula. Já no caso do RMN de ¹³C, seguiu-se a seguinte ordem: solvente; δ em ppm.

3.2.1 Ácidos barbitúricos funcionalizados com AG

3.2.1.1 Híbridos de ácido *N,N'*-dimetilbarbitúrico e AG

Após otimização das condições reacionais previamente descritas,^{46,47} à solução do respetivo AG (1 mmol) em 2 ml de diclorometano seco, foram adicionadas, gota-a-gota e pela ordem indicada, as soluções de DCC (1,2 mmol; 206,3 mg), DMAP (0,2 mmol; 24,4 mg) e ácido *N,N*-dimetilbarbitúrico (1,2 mmol; 187,3 mg), cada uma em 2 ml de diclorometano seco. O balão reacional foi fechado com um *take-off* de cloreto de cálcio e colocado em agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente. As reações foram seguidas por CCF, utilizando como eluente uma mistura de diclorometano e metanol na proporção 7:1. Após o término da reação, foi adicionado 1 ml de água destilada, por forma a eliminar o DCC em excesso, deixando-se a mistura reacional em agitação por mais 15 minutos. A mistura obtida foi filtrada, por forma a remover a *N,N*-diciclohexilureia formada. O filtrado foi lavado sequencialmente com uma solução aquosa de ácido clorídrico 5% e água destilada. A fase orgânica foi seca sob sulfato de sódio anidro e evaporada à secura. O crude obtido foi suspenso em éter dietílico e filtrado, sendo o filtrado novamente evaporado à secura. Por fim, o crude foi recristalizado de *n*-hexano. Sempre que se verificaram impurezas insolúveis, as mesmas foram removidas por filtração a quente, utilizando para uma pipeta de Pasteur de vidro com algodão. Nos casos em que o produto não precipitava após o arrefecimento, evaporou-se o *n*-hexano, obtendo-se os seguintes produtos **2a-s**:

1,3-Dimetil-5-propionilpiridina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (2a)



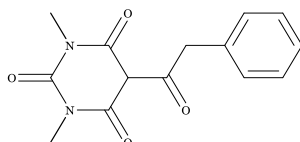
A partir do ácido propanóico; $\eta=82\%$; Óleo amarelo;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,26 (s, $J = 18,9$ Hz, 6H), 3,09 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,15 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H) ppm.

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 164,95, 143,03, 106,48, 39,70, 34,56, 27,58, 9,72 ppm.

SMILES: CCC(C(C(N1C)=O)C(N(C)C1=O)=O)=O

1,3-Dimetil-5-(2-fenilacetil)pirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (2b)



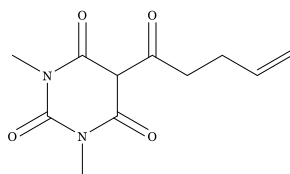
A partir do ácido fenilacético; $\eta = 87\%$; Sólido branco amorfo; p.f. = 274 – 276 °C;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,39 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,33 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 7,27 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H), 4,51 (s, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,35 (s, 3H).

RMN de ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 194,91, 163,47, 151,91, 138,79, 129,70, 127,72, 125,41, 94,99, 48,77, 27,13 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CC2=CC=CC=C2)=O)=O)N(C)C1=O

1,3-Dimetil-5-(pento-4-enoil)pirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (2c)



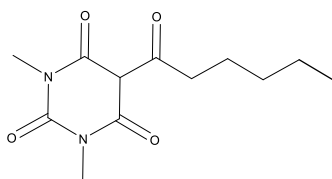
A partir do ácido 4-pentenóico; $\eta = 76\%$, Óleo amarelo escuro;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,79 (ddt, $J = 16, 8, 10,2, 6,5$ Hz, 1H), 5,01 (dd, $J = 17,1, 1,7$ Hz, 2H), 4,93 (dd, $J = 10,2, 1,6$ Hz, 1H), 3,27 (s, 6H), 3,16 (dd, $J = 8,3, 6,7$ Hz, 2H), 2,36 (qt, $J = 6,5, 1,5$ Hz, 2H) ppm.

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 198,65, 169,69, 160,71, 150,23, 136,40, 115,73, 95,29, 35,94, 29,32, 27,92, 27,75 ppm.

SMILES: C=CCCC(C(C(N1C)=O)C(N(C)C1=O)=O)=O

5-Hexanoil-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2d)



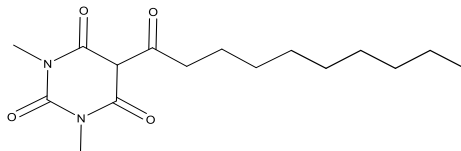
A partir do ácido hexanóico; $\eta = 92\%$, óleo amarelo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,25 (d, $J = 16,7$ Hz, 6H), 3,08 – 2,99 (m, 2H), 1,60 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,30 (ddt, $J = 12,8, 9,5, 4,6$ Hz, 5H), 0,82 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H) ppm.

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,79, 169,72, 150,29, 95,11, 36,63, 31,55, 27,91, 27,71, 25,47, 22,32, 13,83 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCC)=O)=O)N(C)C1=O

5-Decanoil-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2e)



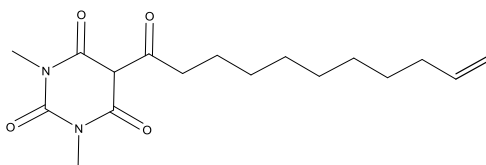
A partir do ácido decanóico; $\eta = 82\%$; sólido branco amorfo; 33 – 34 °C;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,30 (s, 3H), 3,19 (s, 3H), 3,08 – 3,00 (m, 2H), 1,59 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,33 – 1,15 (m, $J = 7,0$ Hz, 12H), 0,79 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H) ppm.

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,85, 169,76, 150,93, 95,14, 53,34, 36,75, 33,55, 31,85, 29,49, 29,43, 29,32, 29,25, 27,95, 27,76, 25,84, 24,41, 22,64, 14,07 ppm.

SMILE: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCCCC)=O)=O)N(C)C1=O

1,3-Dimetil-5(undec-10-enoil)pirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2f)



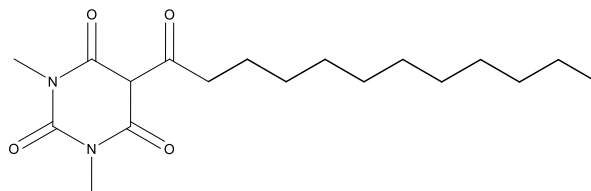
A partir do ácido 10-undecenóico; $\eta = 62\%$; sólido branco amorfo; p.f. 32 – 33 °C;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,96 – 5,70 (m, 1H), 5,05 – 4,87 (m, 2H), 3,35 (s, 3H), 3,31 (s, 3H), 3,11 (t, $J = 7,8$ Hz, 2H), 2,02 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,67 (p, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,48 – 1,18 (m, 10H) ppm.

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 200,03, 169,90, 160,97, 150,52, 139,27, 114,25, 95,31, 36,89, 33,89, 29,58, 29,41, 29,36, 29,16, 28,99, 28,14, 27,94, 25,96 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCCCC=C)O)=O)N(C)C1=O

5-Dodecanoil-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2g)



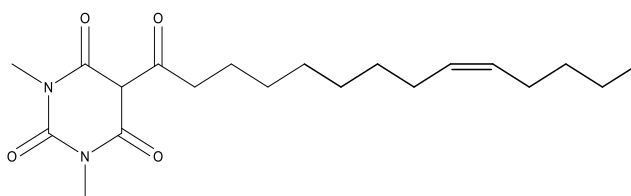
A partir do ácido dodecanóico; η = 78%; sólido branco amorfo, p.f. 49 – 50 °C;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,28 (s, 3H), 3,24 (s, 3H), 3,05 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 1,61 (p, J = 7,5 Hz, 2H), 1,33 (p, J = 7,0 Hz, 2H), 1,29 – 1,13 (m, 10H), 0,80 (t, J = 6,7 Hz, 3H) ppm.

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,85, 169,76, 160,78, 150,34, 95,14, 77,48, 77,16, 76,84, 36,75, 31,85, 29,49, 29,43, 29,32, 29,25, 27,95, 27,76, 27,62, 25,84, 22,64, 14,07 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCCCCCC)O)=O)N(C)C1=O

(Z)-1,3-dimetil-5-(tetradec-9-enoil)pirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2h)



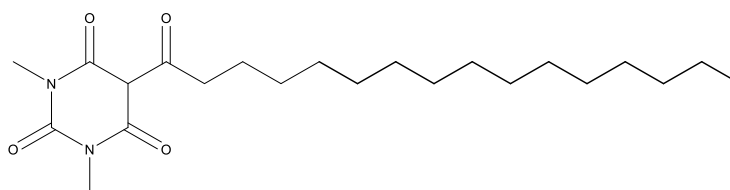
A partir do ácido miristoleico; η = 85%; óleo amarelo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,34 (m, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,32 (s, 3H), 3,12 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,00 (q, J = 6,3 Hz, 4H), 1,45 – 1,22 (m, 14H), 0,94 – 0,84 (m, 3H) ppm.

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 200,06, 169,91, 160,99, 150,55, 130,07, 129,89, 95,33, 36,92, 32,08, 29,81, 29,60, 29,34, 29,24, 28,16, 27,97, 27,29, 27,04, 25,97, 22,47, 14,13 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCC/C=C\CCCC)O)=O)N(C)C1=O

1,3-Dimetil-5-palmitoilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (2i)



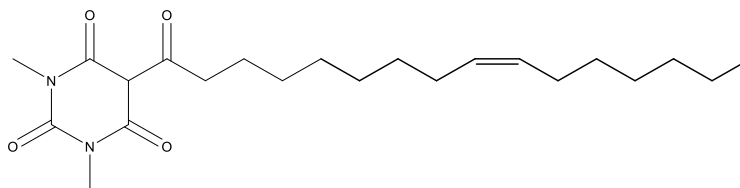
A partir do ácido palmítico; $\eta = 79\%$; sólido branco amorfo; p.f. 49 – 50 °C;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,37 (s, 3H), 3,33 (s, 3H), 3,12 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 1,68 (p, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,40 (p, $J = 7,7$ Hz, 2H), 1,34 – 1,14 (m, 22H), 0,87 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm.

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 200,09, 169,91, 160,98, 150,54, 95,31, 36,93, 32,05, 29,82, 29,81, 29,79, 29,78, 29,72, 29,63, 29,61, 29,49, 29,46, 28,14, 27,95, 26,00, 22,82, 14,24 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCCCCCCCCCC)=O)=O)N(C)C1=O

(*Z*)-5-(Hexadec-9-enoil)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (2j)



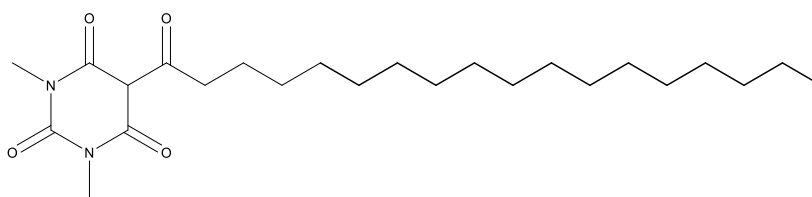
A partir do ácido palmítoleico; $\eta = 76\%$; óleo amarelo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,38 – 5,20 (m, 2H), 3,31 (s, 3H), 3,28 (s, 3H), 3,08 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 2,10 – 1,88 (m, 4H), 1,64 (p, $J = 7,8$ Hz, 2H), 1,44 – 1,15 (m, 16H), 0,90 – 0,77 (m, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,84, 169,75, 160,79, 150,35, 129,94, 129,70, 95,15, 36,75, 31,76, 29,71, 29,66, 29,45, 29,20, 29,09, 28,96, 27,96, 27,77, 27,19, 27,14, 25,81, 22,64, 14,08 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCC/C=C\CCCCC)=O)=O)N(C)C1=O

1,3-Dimetil-5-estearilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2k)



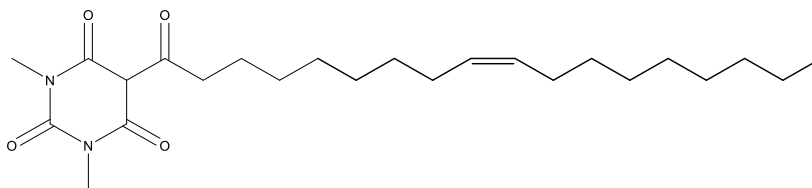
A partir do ácido esteárico; $\eta = 80\%$; sólido branco amorfo; p.f. 66 – 67 °C;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3,32 (s, 3H), 3,21 (s, 3H), 3,10 – 3,01 (m, 2H), 1,61 (p, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,34 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,24 – 1,19 (m, 26H), 0,80 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H) ppm.

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,95, 169,78, 150,40, 95,19, 36,80, 31,93, 29,70, 29,67, 29,61, 29,52, 29,49, 29,37, 29,34, 28,01, 27,81, 25,87, 22,69, 14,12 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCCCCCCCCCCCC)=O)=O)N(C)C1=O~

1,3-Dimetil-5-oleoilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2l)



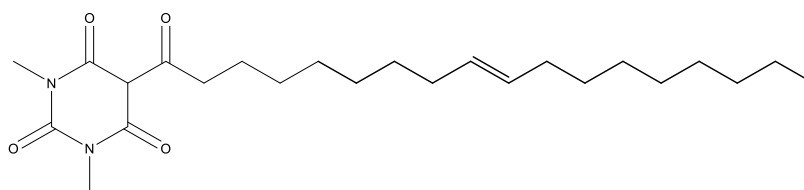
A partir do ácido oleico; $\eta = 75\%$; Óleo cor-de-laranja;

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ 5,47 – 5,18 (m, 2H), 3,35 (s, 3H), 3,31 (s, 3H), 3,11 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 2,12 – 1,89 (m, 4H), 1,74 – 1,53 (m, 2H), 1,47 – 1,08 (m, 20H), 0,86 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C [1] (101 MHz, CDCl_3) δ 199,91, 169,78, 129,99, 129,73, 36,78, 31,91, 29,76, 29,69, 29,65, 29,60, 29,52, 29,47, 29,32, 29,22, 29,12, 28,01, 27,82, 27,22, 27,17, 25,84, 22,68, 14,11;

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCC/C=C\CCCCCCC)=O)=O)N(C)C1=O

(E)-1,3-Dimetil-5-(octadec-9-enoil)pirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2m)



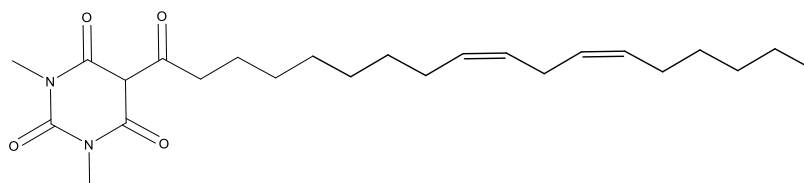
A partir do ácido elaidico; $\eta = 50\%$; sólido branco amorfo; p.f. 35 – 36 °C;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,31 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,31 (s, 3H), 3,09 – 3,01 (m, 2H), 1,89 (m, 4H), 1,60 (p, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,33 – 1,19 (m, 20H), 0,80 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,92, 169,78, 160,84, 150,40, 130,46, 130,20, 36,78, 32,61, 32,55, 31,91, 29,65, 29,56, 29,49, 29,47, 29,32, 29,19, 28,96, 28,01, 27,82, 25,85, 22,68, 14,11 ppm;

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCC/C=C/CCCCCCC)=O)=O)N(C)C1=O

1,3-Dimetil-5-((9Z,12Z)octadeca-9,12-dienoil)pirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2n)



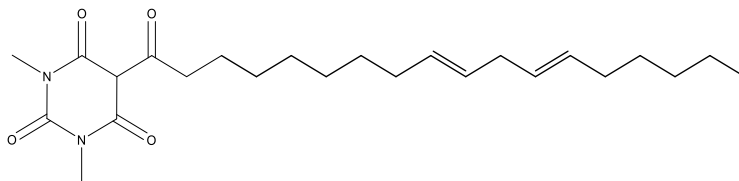
A partir do ácido linoleico; η (1) = 61%; óleo transparente;

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ 5,44 – 5,27 (m, 4H), 3,31 (s, 3H), 3,27 (s, 3H), 3,18 – 3,08 (m, 2H), 2,77 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 6,8$ Hz, 4H), 1,68 (p, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,47–1,24 (m, 14H), 0,89 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,88, 169,78, 160,84, 150,40, 130,19, 130,02, 128,04, 127,90, 36,77, 31,52, 29,59, 29,46, 29,35, 29,22, 29,12, 28,01, 27,82, 27,19, 25,83, 25,63, 22,57, 14,07 ppm;

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCC/C=C\C/C=C\CCCC)=O)=O)N(C)C1=O

1,3-Dimetil-5-((9E,12E))-octadeca-9,12-dienoil)pirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2o)



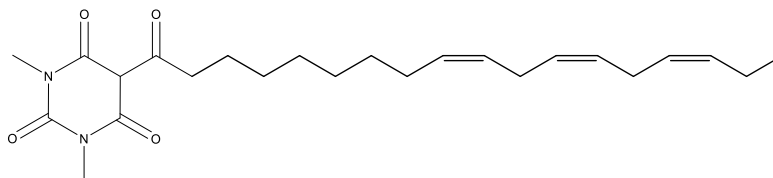
A partir do ácido linoeláidico; $\eta = 66\%$; óleo laranja;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 (m, 4H), 3,36 (s, 3H), 3,32 (s, 3H), 3,23 – 3,10 (m, 2H), 2,68 (t, $J = 4,4$ Hz, 2H), 2,04 – 1,89 (m, 4H), 1,88 – 1,56 (m, 2H), 1,42 – 1,23 (m, 14H), 0,90 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,94, 169,79, 160,87, 150,43, 131,11, 130,93, 128,70, 128,54, 36,79, 35,66, 34,93, 33,58, 32,55, 32,53, 31,43, 29,46, 29,23, 29,19, 29,00, 28,04, 27,85, 25,87, 24,71, 24,44, 22,56, 14,09 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCC/C=C/C/C=C/CCCC)=O)=O)N(C)C1=O

1,3-Dimetil-5-((9Z,12Z,15Z))-octadeca-9,12,5-trienoil)pirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2p)



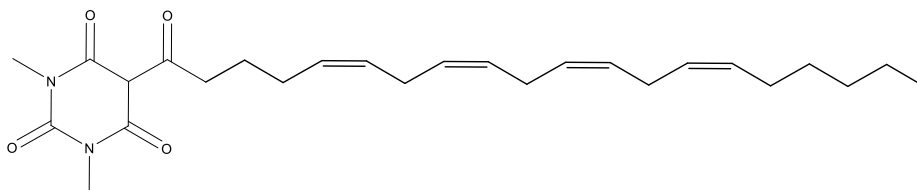
A partir do ácido α -linolénico; $\eta = 81\%$; óleo amarelo torrado;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,46 – 5,27 (m, 6H), 3,36 (s, 3H), 3,32 (s, 3H), 3,19 – 3,10 (m, 2H), 2,82 (t, $J = 6,0$ Hz, 4H), 2,09 (m, 4H), 1,71 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,49 – 1,39 (m, 2H), 1,43 – 1,29 (m, 8 H), 0,99 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,91, 169,79, 131,96, 130,27, 128,28, 128,25, 127,74, 127,12, 36,79, 29,58, 29,46, 29,22, 29,12, 28,04, 27,85, 27,21, 25,84, 25,62, 25,53, 20,56, 14,2 ppm.

SMILES: O=C(N(C)C(C1C(CCCCCC/C=C\C/C=C\C/C=C\CC)=O)=O)N(C)C1=O

5-((5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenoil)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2q)



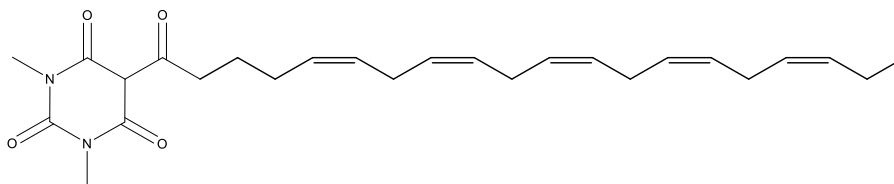
A partir do ácido araquidônico; $\eta = 90\%$; óleo amarelo torrado.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,46 – 5,26 (m, 8H), 3,36 (s, 3H), 3,32 (s, 3H), 3,22 – 3,08 (m, 2H), 2,87 – 2,78 (m, 6H), 2,20 (q, $J = 6,9$ Hz, 2H), 2,05 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,77 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,38 – 1,23 (m, 6H), 0,86 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,68, 169,90, 160,94, 150,53, 130,62, 129,13, 128,99, 128,71, 128,36, 128,28, 127,99, 127,67, 95,42, 36,49, 31,65, 29,46, 28,17, 27,98, 27,35, 27,09, 25,81, 25,76, 22,71, 14,21 ppm.

SMILES : O=C(N(C)C(C1C(CCC/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\CCCC)=O)=O)N(C)C1=O

5-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenoil)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2r)



A partir do ácido eicosopentanoico; $\eta = 95\%$; óleo amarelo;

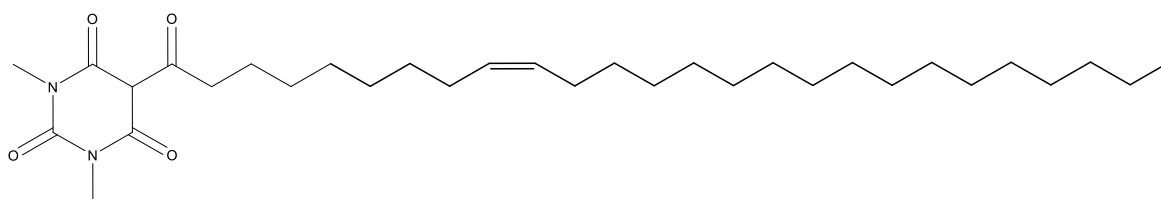
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,60 – 5,23 (m, 10H), 3,36 (s, 3H), 3,32 (s, 3H), 3,19 – 3,10 (m, 2H), 2,82 (dt, $J = 14,9, 6,1$ Hz, 8H), 2,20 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,07 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,77 (p, $J = 7,5$ Hz, 2H), 0,96 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 199,67, 169,90, 160,93, 150,52, 132,16, 129,10, 129,01, 128,69, 128,39, 128,34, 128,28, 128,22, 128,01, 127,14, 95,41, 36,48, 28,17, 27,98, 27,09, 25,80, 25,77, 25,75, 25,66, 20,69, 14,40 ppm.

SMILES:

O=C(N(C)C(C1C(CCC/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\CC)=O)=O)N(C)C1=O

(Z)-5-Hexacos-9-enoil)-1,3-dimetilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (2s)



A partir do ácido erúxico; $\eta = 72\%$; óleo amarelo;

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,31 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 3,34 (s, 3H), 3,30 (s, 3H), 3,17 – 3,04 (m, 2H), 1,98 (q, $J = 6,4$ Hz, 4H), 1,66 (p, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,45 – 1,35 (m, 2H), 1,35 – 1,14 (m, 26H), 0,85 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm;

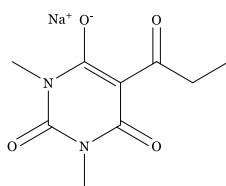
RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 200,00, 169,85, 160,91, 150,47, 129,95, 129,92, 95,25, 36,88, 32,00, 29,86, 29,71, 29,69, 29,64, 29,62, 29,60, 29,58, 29,42, 29,41, 28,08, 27,88, 27,29, 25,95, 22,77, 14,19 ppm.

SMILES : O=C(N(C)C(C1C(CCCCCC/C=C\CCCCCCCCCCCCCCC)=O)=O)N(C)C1=O

3.2.1.2 Sais dos híbridos de ácidos *N, N*-dimetilbarbitúrico e AG

À solução do respetivo híbrido **2a-s** (1 mmol) em 1 ml de etanol, foi adicionada a solução de hidróxido de sódio (1 mmol; 40 mg) em 100 μl de água destilada. A mistura obtida foi aquecida à ebulição, sob agitação constante, até se verificar a dissolução dos compostos. De seguida, procedeu-se à filtração a quente, recorrendo a uma pipeta de Pasteur de vidro com algodão, por forma a retirar quaisquer impurezas insolúveis. Por fim, deixou-se arrefecer lentamente antes de se deixar a cristalizar overnight no frigorífico. Os cristais obtidos foram isolados por filtração, obtendo-se os seguintes sais de sódio **2ab-sb**:

1,3-Dimetil-5-propionil-1,2,3,6-tetrahidropirimidinatriona de sódio(2ab)



A partir do híbrido **2a**; $\eta = 75 \%$; Sólido branco cristalino; p.f. 328 – 333 °C;

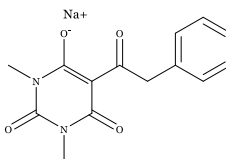
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,08 (s, 6H), 2,76 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H), 0,94 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 198,43, 163,32, 151,95, 94,83, 36,07, 27,04, 9,97 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}): 2956, 2915, 2852, 1720, 1662, 1568, 1484, 1472, 1369, 1275, 1227 1044,1005, 879, 789, 755, 714;

SMILES: CCC(C(C(N1C)=O)=C([O-])N(C)C1=O)=O.[Na+]

1,3-Dimetil-2,6-dioxo-5-(2-fenilacetil)-1,2,3,6-tetrahidropirimidin-4-olato de sódio (2bb)



A partir do híbrido **2b**; $\eta = 80 \%$; sólido branco cristalino; p.f. 321 – 322 °C;

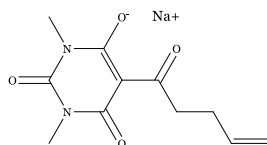
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7,31 – 7,18 (m, 4H), 7,18 – 7,07 (m, 1H), 4,17 (s, 2H), 3,10 (s, 6H);

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 194,91, 163,47, 151,91, 138,79, 129,70, 127,72, 125,41, 94,99, 48,77, 27,13 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2953, 1690 1626, 1601, 1588, 1416, 1380, 1256, 1007, 855, 784, 449,711, 674;

SMILES: O=C(N(C)C([O-])=C1C(CC2=CC=CC=C2)=O)N(C)C1=O.[Na+]

1,3-Dimetil-2,6-dioxo-5-(pento-4-enil)-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2cb)



A partir do híbrido **2c**; $\eta = 87\%$; Sólido branco cristalino; p.f. 255 – 257 °C;

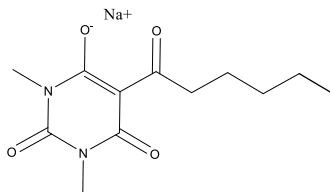
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6,05 – 5,68 (m, 1H), 5,14 – 4,82 (m, 2H), 3,09 (s, 6H), 2,96 – 2,77 (m, 2H), 2,22 (tt, $J = 7,9, 4,1$ Hz, 2H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 196,78, 163,37, 151,88, 139,43, 114,01, 95,03, 42,33, 29,54, 27,04;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2956, 1706, 1615, 1585, 1417, 1232, 997, 911, 868, 799, 757, 667;

SMILES: C=CCCC(C1=C([O-])N(C)C(N(C)C1=O)=O)=O.[Na+]

5-Hexanoil-1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2db)



A partir do híbrido **2d**; $\eta = 81\%$; Sólido branco cristalino; p.f. 230 – 231°C;

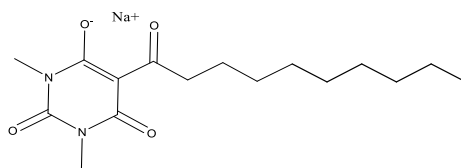
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,07 (s, 6H), 2,78 – 2,66 (m, 2H), 1,45 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,33 – 1,16 (m, 4H), 0,85 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 197,56, 162,95, 152,04, 94,85, 43,11, 31,59, 26,96, 25,07, 22,23, 14,01 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2961, 2873, 1707, 1636, 1569, 1522, 1453, 1425, 1393, 1230, 1216, 1017, 995, 911, 861, 844, 791, 758, 726, 714, 664;

SMILES: O=C1N(C)C([O-])=C(C(CCCCC)=O)C(N1C)=O.[Na+]

5-Decanoil-1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2e)



A partir do híbrido **2e**; $\eta = 63\%$; Sólido branco cristalino; p.f. 183 – 184 °C;

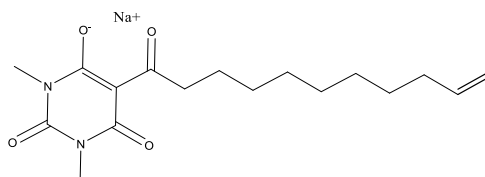
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,08 (s, 6H), 2,74 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,61 – 1,34 (m, 2H), 1,23 (s, 12H), 0,85 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 198,05, 163,32, 151,92, 95,02, 43,18, 31,36, 29,35, 29,21, 29,07, 28,78, 27,02, 25,44, 22,13, 13,98 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2925, 2854, 108, 1617, 1588, 1524, 1430, 1230, 1000, 865, 791, 760, 720, 667;

SMILE: O=C1N(C)C([O-])=C(C(CCCCCCCC)=O)C(N1C)=O.[Na+]

1,3-Dimetil-2,6-dioxo-5-(undec-10-enoil)-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2fb)



A partir do híbrido **2f**; $\eta = 76\%$; sólido branco cristalino; p.f. 180 - 182 °C;

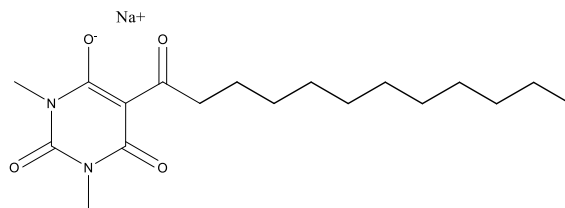
RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 5,94 – 5,72 (m, 1H), 5,10 – 4,82 (m, 2H), 3,08 (s, 6H), 2,74 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,99 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,45 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,32 (p, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,23 (s, 8H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 198,02, 163,31, 151,92, 138,86, 114,63, 95,01, 43,17, 33,22, 29,33, 29,15, 28,92, 28,59, 28,34, 27,02, 25,43 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3435, 2925, 2852, 1706, 1590, 1526, 1420, 1386, 1233, 999, 907, 866, 789, 761, 715, 667;

SMILES: O=O=C1N(C)C([O-])C(C(CCCCCCCC=C)=O)C(N1C)=O.[Na+]

5-Dodecanoil-1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2gb)



A partir do híbrido **2g**; $\eta = 65\%$; sólido branco cristalino p.f. 179 – 180 °C;

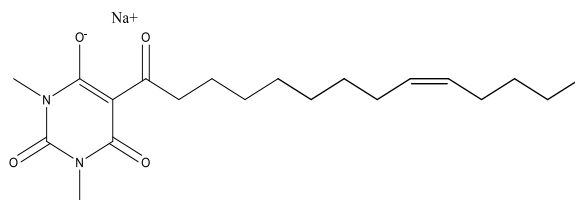
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,08 (s, 6H), 2,78 – 2,70 (m, 2H), 1,45 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,24 (s, 16H), 0,85 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 197,95, 163,25, 151,92, 94,98, 43,17, 31,33, 29,34, 29,19, 29,11, 29,07, 28,75, 27,00, 25,43, 22,12, 13,97 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2923, 2852, 1707, 1616, 1585, 1523, 1423, 1393, 1231, 997, 866, 792, 759, 666;

SMILES: O=C1N(C)C([O-])=C(CCCCCCCCCC)C(=O)N1C=O.[Na+]

(Z)-1,3-dimetil-2,6-dioxo-5-(tetradec-9-enoil)-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2hb)



A partir do híbrido **2h**; $\eta = 73\%$; sólido branco cristalino; p.f. 292 – 293 °C;

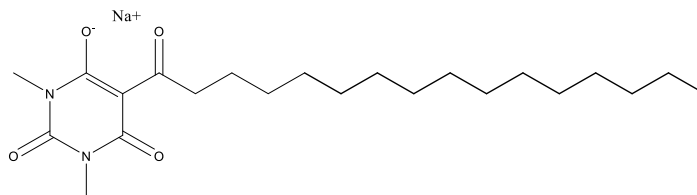
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5,45 – 5,21 (m, 2H), 3,07 (s, 6H), 2,72 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,11 – 1,90 (m, 4H), 1,45 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,36 – 1,14 (m, 12H), 0,85 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 197,70, 163,07, 151,98, 129,68, 129,58, 94,88, 56,03, 43,17, 31,37, 29,32, 29,17, 29,02, 28,66, 26,97, 26,62, 26,32, 25,40, 21,72, 18,57, 13,83 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2925, 2854, 1710, 1615, 1586, 1523, 1427, 1345, 1230, 1094, 999, 865, 865, 826, 792, 759;

SMILES: O=C1N(C)C([O-])=C(CCCCCC/C=C\CCCC)C(=O)N1C=O.[Na+]

1,3-Dimetil-2,6-dioxo-5-palmitoilpirimidina-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2ib)



A partir do híbrido **2i**; $\eta = 62\%$; sólido branco cristalino; p.f. 172 – 177 °C;

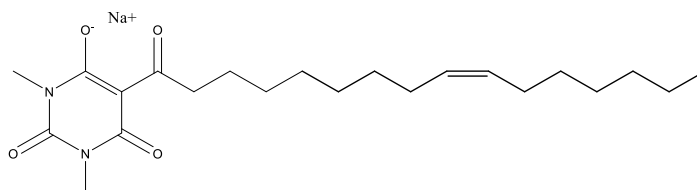
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,08 (s, 6H), 2,83 – 2,62 (m, 2H), 1,45 (s, 2H), 1,22 (s, 24H), 1,04 – 0,64 (m, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 198,06, 163,33, 151,91, 95,02, 43,18, 31,34, 29,37, 29,22, 29,13, 29,10, 29,06, 28,76, 27,01, 25,44, 22,13, 13,95 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2957, 2915, 2852, 1720, 1663, 1563, 1493, 1472, 1367, 1275, 1227, 1043, 1004, 878, 808, 789, 755, 714;

SMILES: O=C1N(C)C([O-])=C(C(CCCCCCCCCCCCCC)=O)C(N1C)=O.[Na+]

(Z)-5-(Hexadec-9-enoil)-1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2jb)



A partir do híbrido **2j** $\eta = 48\%$; sólido branco cristalino; p.f. 175 – 177 °C;

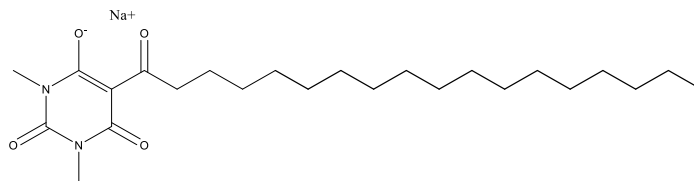
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5,42 – 5,21 (m, 2H), 2,74 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,97 (q, $J = 6,3$ Hz, 4H), 1,45 (p, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,35 – 1,16 (m, 16H), 0,84 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 197,92, 163,24, 151,94, 129,68, 129,63, 94,97, 43,18, 31,16, 29,34, 29,19, 29,12, 29,04, 28,68, 28,30, 27,00, 26,64, 26,62, 25,42, 22,11, 13,94 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 225, 2854, 1711, 1638, 1616, 1585, 1522, 1430, 1398, 1228, 999, 865, 792, 759, 721, 667;

SMILES: O=C1N(C)C([O-])=C(C(CCCCCC/C=C\CCCCC)=O)C(N1C)=O.[Na+]

1,3-Dimetil-2,6-dioxo-5-estearil-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2kb)



A partir do híbrido **2k**; $\eta = 42\%$; sólido branco cristalino; p.f. 202 – 204 °C;

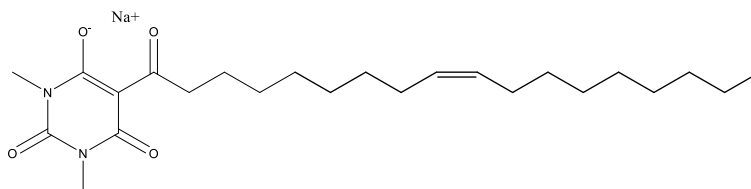
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,08 (s, 6H), 2,74 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,45 (s, 2H), 1,22 (s, 28H), 0,85 (s, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 198,02, 163,31, 151,92, 95,01, 43,18, 31,33, 29,37, 29,21, 29,12, 29,09, 29,05, 28,75, 27,01, 25,44, 22,13, 13,96 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2957, 2914, 2852, 1720, 1662, 1569, 1494, 1472, 1367, 1275, 1227, 1043, 1004, 879, 789, 755, 714;

SMILES: O=C1N(C)C([O-])C(C(CCCCCCCCCCCCCCCC)=O)C(N1C)=O.[Na+]

1,3-Dimetil-5-oleoilpirimidina)-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2lb)



A partir do híbrido **2l**; $\eta = 81\%$; sólido branco cristalino; p.f. 178 – 180 °C;

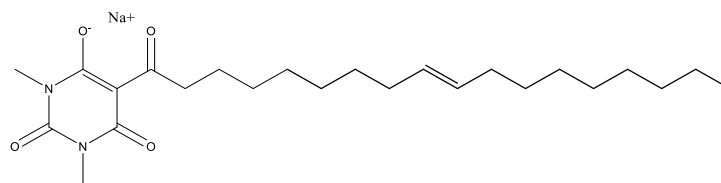
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5,49 – 5,23 (m, 2H), 3,08 (s, 6H), 2,74 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,97 (q, $J = 6,6$ Hz, 4H), 1,46 (p, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,23 (d, $J = 6,9$ Hz, 20H), 0,90 – 0,74 (m, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 197,98, 163,29, 151,92, 129,67, 129,61, 94,99, 43,18, 31,30, 29,36, 29,20, 29,12, 29,05, 28,86, 28,75, 28,71, 28,62, 27,00, 26,65, 26,59, 25,43, 22,11, 13,94 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2924, 2852, 2119, 1713, 1638, 1617, 1585, 1522, 1449, 1398, 1229, 999, 865, 792, 459, 721, 666;

SMILES: O=C1N(C)C([O-])=C(C(CCCCCC/C=C\CCCCCCC)=O)C(N1C)=O.[Na+]

(E)-1,3-Dimetil-5-(octadec-9-enoil)2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2mb)



A partir do híbrido **2m**; η = 65%; sólido branco cristalino; p.f. 184 – 186 °C;

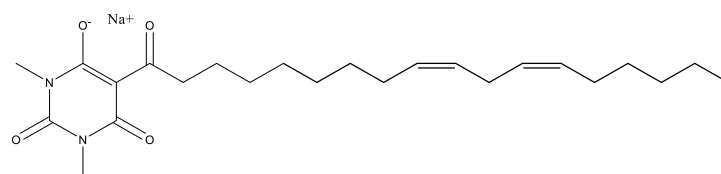
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) δ 5,35 (t, J = 3,8 Hz, 2H), 3,08 (s, 6H), 2,81 – 2,68 (m, 2H), 1,92 (q, J = 6,0 Hz, 4H), 1,45 (p, J = 7,4 Hz, 2H), 1,35 – 1,12 (m, 20H), 0,84 (t, J = 6,7 Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO d_6) δ 198,02, 163,31, 151,91, 130,11, 130,05, 95,01, 43,17, 32,02, 31,98, 31,30, 29,36, 29,09, 29,05, 29,02, 28,85, 28,73, 28,59, 28,51, 27,02, 25,44, 22,12, 13,96 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2922, 2852 1709, 1618, 1586.1524, 1428, 1397, 1230, 998, 865, 791, 759, 667;

SMILES: O=C1N(C)C([O-])=C(C(CCCCCC/C=C/CCCCCCC)=O)C(N1C)=O.[Na+]

1,3-Dimetil-5-((9Z,12Z)octadeca-9,12-dienoil)-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina-4-olato de sódio (2nb)



A partir do híbrido **2n**; η = 70%; sólido branco cristalino; p.f. 130 – 132 °C;

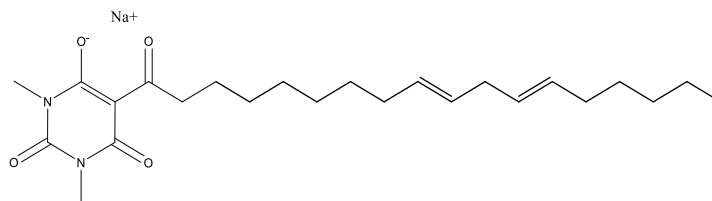
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5,49 – 5,09 (m, 4H), 3,08 (s, 6H), 2,81 – 2,68 (m, 4H), 2,00 (q, J = 6,7 Hz, 4H), 1,45 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 1,39 – 1,11 (m, 14H), 0,84 (t, J = 6,7 Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 198,07, 163,34, 151,96, 129,80, 129,77, 127,79, 127,76, 95,04, 43,23, 30,95, 29,39, 29,16, 29,10, 28,78, 27,05, 26,73, 26,65, 25,48, 25,26, 22,03, 13,95 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2922, 2852, 1708, 1618, 1586, 1524, 1428, 1397, 1230, 998, 865, 791, 759, 666;

SMILES: O=C1N(C)C([O-])=C(C(CCCCCC/C=C\C/C=C\CCCC)=O)C(N1C)=O.[Na+]

(E)-1,3-Dimetil-5-(octadec-9-enoil)-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidina de sódio (2ob)



A partir do híbrido **2o**; $\eta = 50\%$; sólido branco cristalino; p.f. 189 – 191 °C;

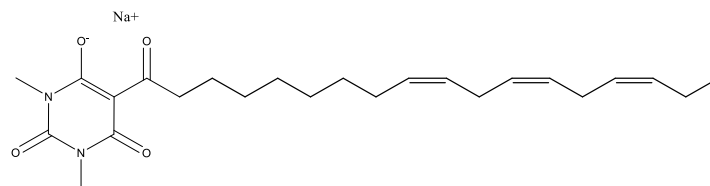
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5,49 – 5,28 (m, 4H), 3,08 (s, 6H), 2,73 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 2,67 – 2,62 (m, 2H), 1,95 (q, $J = 6,3$ Hz, 4H), 1,45 (p, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,38 – 1,15 (m, 14H), 0,85 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 197,69, 163,05, 152,00, 130,63, 130,60, 128,46, 128,43, 94,89, 43,15, 34,98, 31,96, 31,89, 30,79, 29,33, 29,02, 28,99, 28,63, 28,60, 26,97, 25,40, 21,96, 13,95 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3008, 2925, 1854, 1706, 1618, 1588, 1525, 1431, 1397, 1231, 1000, 791, 760, 722;

SMILES: O=C(N(C)C([O-])=C1C(CCCCCC/C=C/C/C=C/CCCC)=O)N(C)C1=O.[Na+]

1,3-Dimetil-5-((9Z,12Z,15Z))-octadeca-9,12,5-trienoil)-2,6-dioxohexahidropirimidina-4-olato de sódio (2pb)



A partir do híbrido **2p**; $\eta = 61\%$; sólido amarelo cristalino; p.f. 132 – 133 °C;

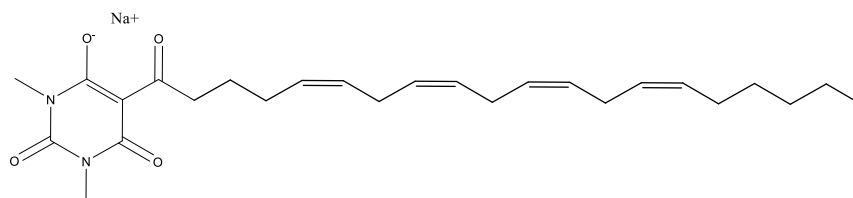
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5,52 – 5,14 (m, 6H), 3,08 (s, 6H), 2,76 (dt, $J = 14,2$, 6,9 Hz, 6H), 2,03 (q, $J = 7,4$ Hz, 4H), 1,46 (p, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,38 – 1,18 (m, 8H), 0,92 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 197,85, 163,19, 151,93, 131,49, 129,94, 127,94, 127,90, 127,52, 126,98, 94,93, 43,17, 29,34, 29,10, 29,05, 28,72, 26,98, 26,68, 25,42, 25,20, 25,11, 20,04, 14,11 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 3008, 2925, 2854, 1707, 1618, 1588, 1525, 1431, 1397, 1231, 999, 791, 760, 722;

SMILES: O=C(N(C)C([O-])C1C(CCCCCC/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\CC)=O)N(C)C1=O.[Na+]

5-((5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosa-5,8,11,14-tetraenoil)-1,3-dimetil-2,6-dioxohexahidropirimidina-4-olato de sódio (2qb)



A partir do híbrido **2q**; $\eta = 55\%$; sólido amarelo cristalino; p.f. 97 – 99 °C;

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5,51 – 5,10 (m, 8H), 3,09 (s, 6H), 2,85 – 2,70 (m, 8H), 2,09 – 1,97 (m, 4H), 1,54 (p, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,41 – 1,07 (m, 6H), 0,84 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H) ppm;

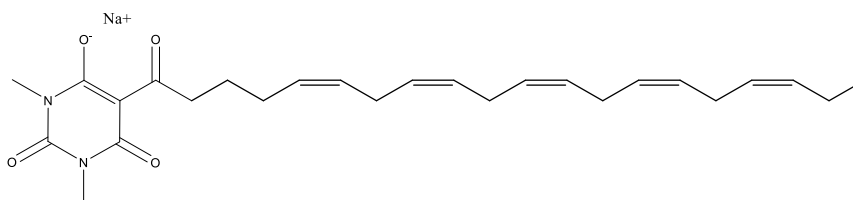
RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 197,59, 163,22, 151,92, 130,23, 129,93, 128,15, 128,08, 127,72, 127,69, 127,53, 127,45, 95,01, 42,78, 30,89, 28,73, 26,98, 26,93, 26,61, 25,46, 25,24, 25,22, 25,20, 21,99, 13,92 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2925, 2854, 1710, 1616, 1587, 1523, 1427, 1345, 1230, 1094, 999, 866, 826, 792, 759;

SMILES:

O=C(N(C)C([O-])C1C(CCC/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\CCCC)=O)N(C)C1=O.[Na+]

5-((5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Icosa-5,8,11,14,17-pentaenoil)-1,3-dimetil-2,6-dioxohexahidropirimidin-4-olato de sódio (2rb)

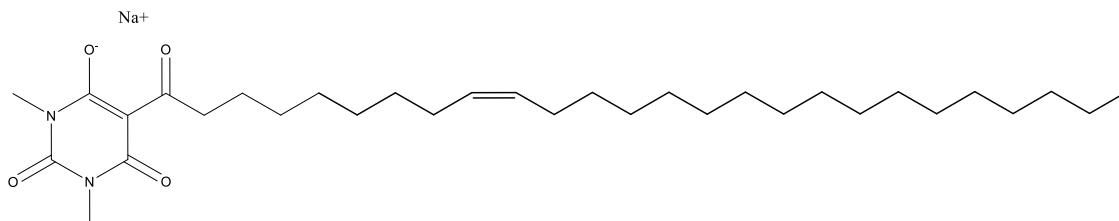


A partir do híbrido **2r**; Os dados espectrais de ^1H e ^{13}C dão a entender que houve degradação do produto formado.

SMILES:

O=C(N(C)C(C1C(CCC/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\C/C=C\CC)=O)=O)N(C)C1=O

(Z)-5-(Hexacos-9-enoilo)-1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropirimidin-4-olato de sódio (2sb)



A partir do híbrido **2s**; $\eta = 70\%$; sólido amarelo cristalino; p.f. 231 – 233 °C;

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) 5,44 – 5,16 (m, 2H), 3,08 (s, 6H), 2,74 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H), 1,98 (q, $J = 6,4$ Hz, 4H), 1,46 (p, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,24 (d, $J = 3,3$ Hz, 28H), 0,85 (t, $J = 6,6$ Hz, 3H) ppm;

RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) δ 197,90, 197,84, 163,18, 151,95, 129,65, 94,94, 43,17, 31,30, 29,34, 29,20, 29,10, 29,04, 28,89, 28,85, 28,72, 28,60, 26,98, 26,57, 25,40, 25,36, 22,11, 13,95 ppm;

FTIR $\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1}) 2922, 2852, 1711, 1618, 1587, 1524, 1427, 1230, 998, 865, 791, 759;

SMILES:

O=C1N(C)C([O-])=C(C(CCCCCC/C=C\CCCCCCCCCCCCCCCC)=O)C(N1C)=O.[Na+]

3.4. Avaliação biológica dos compostos sintetizados

A Linha celular não neoplásica PNT1A e as 2 linhas celulares neoplásicas foram adquiridas à *European Collection of cell Cultures* (ECACC, UK). A linha celular PNT1A é uma linha celular humana derivada de células imortalizadas a partir de epitélio protático normal. A linha celular LNCaP corresponde a células de CPR, que foram obtidas originalmente de metástases de um nódulo linfático, esta linha celular expressa o RA e são responsivas a androgénios. Quanto à linha PC3, são uma linha celular de CPR, obtidas originalmente de uma metastase óssea e o são independentes de androgénios.⁵⁵

Para avaliar a atividade biológica dos compostos em estudo, as culturas celulares foram mantidas em incubadoras *LEEC Culture Safe Precision CO2 Incubators* e manipuladas em câmaras de fluxo laminar *Class II A2 Biological Safety Cabinet*. Os meios de cultura utilizados para estas linhas celulares foram dois meios RPMI (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*) 1640, um com e outro sem vermelho de fenol, que foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* (MO, USA), assim como todos os reagentes e suplementos. As soluções aquecidas no banho *Termotronic II-J.P. Selecta*. As caixas de culturas, as linhas celulares, assim como todo o material utilizado para a manipulação das mesmas foram compradas à

American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Para se realizar a contagem celular utilizou-se o microscópio ótico *Motic Microscópio AE2000 inverse binocular microscope* e a uma câmara de *Neubauer*. Para a preparação de soluções, todo o material e reagentes utilizados foi adquirido à *Sigma-Aldrich (MO, USA)*.

3.4.1 Avaliação da Proliferação Celular

A avaliação da citotoxicidade dos compostos em estudo foi realizada em diferentes linhas celulares, concretamente: linha PC-3 nas passagens 18 a 26, linha LNCaP nas passagens 20-27 e PNT1A nas passagens 83 a 90. Cada experiência foi realizada em quadruplicado e, em pelo menos, dois ensaios independentes.⁵⁶

3.4.1.1 Culturas Celulares

Neste trabalho, todas as linhas celulares utilizadas foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm² a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂, tendo-se procedido à substituição do meio de cultura a cada dois ou três dias.. Todas as linhas celulares foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 % de bicarbonato de sódio, e 1% de antibiótico/antimicótico AB (10,000 unidades/ml de penicilina G, 100 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B).

3.4.1.2 Passagem e contagem de células

A passagem celular realiza-se para que seja possível dar continuidade ao crescimento celular. Ao se observar, ao microscópio ótico, uma confluência celular entre 80-90%, isto é, quando a área superficial do frasco de cultura, onde as células se encontravam a crescer corresponde a esse intervalo de percentagens, iniciava-se o procedimento de desaderencia das células, para que fosse possível a sua utilização nos demais ensaios. Para isso, utilizou-se um método enzimático, nomeadamente à aplicação de tripsina, que iria degradar as proteínas que asseguram a adesão das células à superfície dos frascos de cultura onde se encontram.

Assim, tendo-se verificado que os parâmetros de confluência e morfologia celulares eram os ideais, começou por ser aspirado o meio onde as células se encontravam a crescer, sendo depois adicionado um volume de 5 ml de tripsina-EDTA ,(do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid) a 0,025%, deixando-se esta atuar a 37 °C, (temperatura ótima para a atividade protolítica), durante um período de cinco minutos, e, caso necessário, auxiliava-se a desaderência celular de forma mecânica. Após as células se

encontrarem em suspensão, adicionaram-se 5 mL de meio de cultura completo fresco, (pois a adição de meio completo dilui a tripsina e tem componentes capazes de inibir), perfazendo-se assim 10 mL. De seguida, recolheu-se a suspensão resultante para um *falcon*, o qual foi sujeito à centrifugação durante cinco minutos a 1500 rpm e a 25 °C.

Finalizada a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, tendo sido adicionado meio de cultura completo fresco, para então se proceder à ressuspensão do pellet obtido. Posteriormente, realizou-se a contagem celular através de uma câmara de Neubauer. Para tal, retiraram-se 10 µL da suspensão celular para um eppendorf, onde se adicionaram 10 µL da solução de corante azul tripano 0,25%. Tendo-se homogeneizado a suspensão e transferido 10 µL desta solução para a câmara de Neubauer, de forma a que se conseguisse realizar uma contagem coerente no microscópio ótico. Os fatores que foram tomados em conta foram a consistência do número de células dos quadrantes, a contagem unicamente de células viáveis, (brilhantes e não coradas de azul e/ou que a formação de corpos apoptóticos seja evidente) e caso se encontrassem células nos limites dos quadrantes foram contadas apenas as de 2 arestas. Tendo isso em mente, foi calculado o número de células por mililitro de forma a se preparar suspensões celulares com o número de células ideal para cada um dos ensaios. Tendo sido utilizadas as seguintes fórmulas para o efeito:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = \text{Média de células nos quadrantes} \times \text{Fator diluição (2)} \times 10^4$$

$$\text{N}^\circ \text{ total de células} = \text{N}^\circ \text{ células/mL} \times \text{Volume total de suspensão}$$

3.4.1.3. Preparação de Soluções dos compostos em estudo

Primeiramente, preparou-se uma solução mãe para cada composto em estudo. Para isso, dissolveram-se os compostos em DMSO a uma concentração de 10 mM e armazenaram-se a -20 °C. As diferentes soluções dos compostos foram preparadas posteriormente através de diluições necessárias, que foram em meio de cultura adequado ao ensaio em questão.

No caso do ensaio dos ensaios fluorimétricos, nomeadamente aqueles em que foram utilizados *Bodipy-C16* e Hoescht e, os compostos foram diluídos em meio RPMI (sem vermelho de fenol e FBS desprovido de lípidos, e sem AB). Por outro lado, no ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) foi utilizado meio RPMI completo (com vermelho de fenol, SFB comum e AB). Note-se que as percentagens de SFB eram diferentes. No primeiro caso, em que foi usado o desprovido de lípidos a sua

proporção no meio era de 1% (V/V), enquanto o SFB comum utilizado, no segundo caso foi de 10 %.

Em cada ensaio, a concentração de DMSO foi inferior a 1% (V/V), a qual não exibe um efeito significativo na viabilidade celular, de acordo com dados anteriores obtidos no grupo de investigação.

3.4.1.4. Ensaio de Viabilidade Celular pelo método de MTT

Para se avaliar a viabilidade celular, quantificou-se a extensão da redução do MTT a formazano. Este método foi realizado de acordo com a metodologia utilizada anteriormente no grupo de investigação,⁵⁷ embora com alguns ajustes:

Após a tripsinização e a contagem as células, estas foram semeadas em placas de cultura de 96 poços. Em cada poço adicionou-se 100 µL de suspensão celular, com densidade de células por poço dependente da linha celular em questão. Para as linhas celulares PC3 e PNT1A utilizou-se uma densidade de 7×10^3 células/mL, enquanto que, para as células LNCaP, utilizou-se uma densidade por poço de 2×10^4 células/mL. De seguida, colocaram-se as placas numa incubadora a 37 °C, sob uma atmosfera húmida constituída por 5% de CO₂. Então, aguardou-se 24 horas, para que haja a adesão celular, procedendo-se à substituição do meio pelas soluções dos compostos preparadas anteriormente, exceto nos poços correspondentes ao controlo negativo (células tratadas apenas com meio completo). Ao fim do processo de incubação anterior, aspirou-se o meio, e de seguida adicionou-se uma solução de MTT a 0,5 mg/mL, (preparada a partir da diluição uma solução de MTT 5 mg/ml no meio simples (sem vermelho de fenol, SFB ou AB) e procedeu-se à incubação novamente a durante 4h. No final, removeu-se o sobrenadante e dissolveram-se os cristais de formazano em 100 µL de DMSO. Posteriormente, leram-se e registaram-se os valores de absorbância a 570 nm num espectrofotómetro de microplacas *Bio-Rad xMark™*. A viabilidade celular foi expressa em percentagem, utilizando as células dos poços do controlo negativo, como sendo o máximo de viabilidade possível de obter.

3.4.1.5. Ensaio do influxo de AG através do método Bodipy-C16 e Hoescht 33342

Para se avaliar o influxo de Bodipy-C16 foi quantificada a intensidade de fluorescência apresentada pelo bodipy-C16 contido nas células. Assim, após a tripsinização, ressuspensão em meio simples desprovido de lípidos e a contagem, as células foram semeadas em placas de cultura opacas de 96 poços. Em cada poço adicionou-se 100 µL de suspensão celular, cuja densidade de células por poço foi de 7×10^3 células/mL para as

linhas PNT1A e PC3 e de 2×10^4 células/mL para a linha LNCaP. De seguida, colocaram-se as placas numa incubadora a 37 °C, sob uma atmosfera húmida constituída por 5% de CO₂. Então, aguardou-se 24h, para que haja a adesão celular, procede-se à adição de 100 µM de meio (branco), das soluções dos compostos em estudo a 2 µM, a solução do controlo positivo (SSO), o controlo negativo (ácido 1,3-dimetilbarbiturico), deixando a incubar por 4 horas. Posto isso, retira-se o meio, e adicionou-se 100 µl da solução de *Hoescht* 33342 (5 µg/mL) e *bodipy-C16* (5µM).

Terminados 15 minutos de exposição à solução dos dois fluoróforos anteriores, procedeu-se à lavagem dos poços com meio simples, e adicionou-se meio novo para serem determinadas as fluorescências. Para isso, definiram-se os comprimentos de onda de excitação e emissão adequadas aos 2 fluorómetros utilizados, isto é, 350 e 460 nm, respetivamente, os comprimentos de onda de excitação e emissão do *Hoescht*; no caso do *Bodipy-C16*, foi quantificada a fluorescência nos comprimentos de onda de 485 e 528 nm.

Nota: Os resultados de fluorescência do *bodipy-C16* (Influxo de AG), estarão definidos em função da intensidade relativa da fluorescência do *Hoescht* (número de células), pois na literatura, verifica-se uma relação de proporcionalidade direta entre o influxo de AG e o número de células.⁵⁸

3.5 Análises Estatísticas

Todos os resultados obtidos neste trabalho apresentam-se expressos como média \pm desvio padrão e são representativos, de pelo menos, dois ensaios independentes. Quando mais de 2 grupos foram comparados, foi utilizada a ANOVA one way, através dos testes de Turkey. Foram usados os valores de P para classificar a significância estatística. Para valores de $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***); $p < 0.0001$ (****), todos os restantes aparecerão com a nomenclatura de n.s, ou seja, não significativos. O tratamento de resultados e os estudos estatísticos foram efetuados com o auxílio de dois softwares distintos, o Microsoft Excel 365 e Graph Pad. Os valores de IC₅₀ foram calculados através de curvas sigmoidais dose-resposta com nível de confiança de 95% e com um *constrain* superior a zero, através do software GraphPad Prism 8.3.0

4. Resultados e discussão

Este capítulo encontra-se dividido em três partes, estando organizada segundo a ordem de execução de tarefas. No entanto, existem algumas exceções, nomeadamente os estudos computacionais pós-síntese, que foram realizados após a obtenção de compostos puros. Tendo isso em consideração, simularam-se as suas propriedades, nomeadamente atividade, aplicabilidade e segurança no contexto dos objetivos apresentados anteriormente.

Na primeira parte, encontrar-se-ão apresentados e discutidos os dados referentes ao *design* molecular dos compostos propostos, assim como as simulações computacionais das suas interações para com o alvo a inibir (*docking* molecular), a representação das interações que pudessem condicionar a sua ação e/ou aplicabilidade em trabalhos futuros, nomeadamente em estudos *in vivo* (perfil ADMET) e também os que iriam condicionar a sua utilização na qualidade de fármacos, os parâmetros de *druglikness*.

Relativamente aos estudos de *docking*, estarão subdivididos em estudos de *docking* prévios, realizados sem terem sido obtidos quaisquer produtos de síntese, e em estudos de *docking* pós síntese. No primeiro, pretendia-se antever, de acordo com a literatura, quais das estruturas possíveis iriam providenciar uma melhor atividade. Já o segundo *docking*, apenas foi efetuado tendo em conta a estrutura molecular dos produtos de síntese obtidos. Os restantes estudos *in silico*, mais precisamente os perfis de ADMET e de *druglikness* foram unicamente realizados para as estruturas dos compostos efetivamente sintetizados.

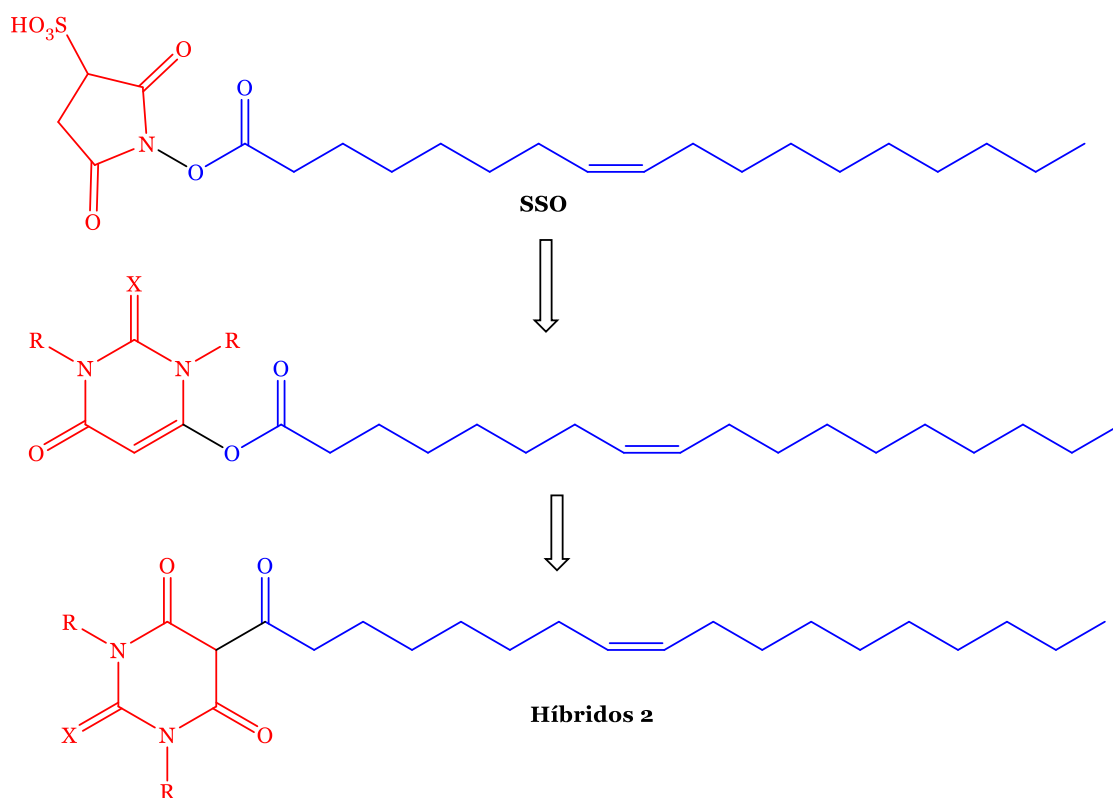
Na segunda parte, estarão documentados e discutidos os resultados referentes às sínteses inicialmente planeadas e às que foram feitas de acordo com as necessidades decorrentes do avançar das tarefas (transformações nos respetivos sais sódicos).

Na terceira parte, serão expostos e debatidos os resultados obtidos nos estudos de avaliação das atividades biológicas, mais especificamente, ensaios de viabilidade celular (MTT) e inibição da capacidade de transporte de AG por parte da proteína CD36, através da combinação dos métodos fluorimétricos *Bodipy-C16* e *Hoescht 33342*.

4.1 Estudos computacionais

4.1.1 Design e docking molecular prévio

Primeiramente, foi realizado o design dos compostos que se pretendiam sintetizar, tendo inicialmente a pretensão de desenvolver bioisósteros do SSO,³⁰ isto é, compostos com propriedades bioativas semelhantes ao composto que serviu como inspiração e eventualmente com características melhoradas contexto da inibição do CD36, esquema 2.

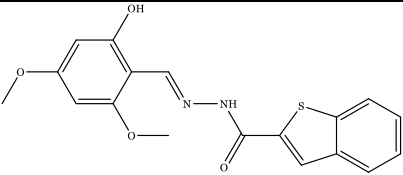
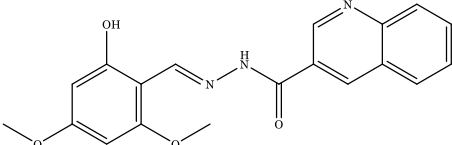
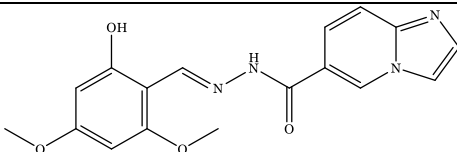
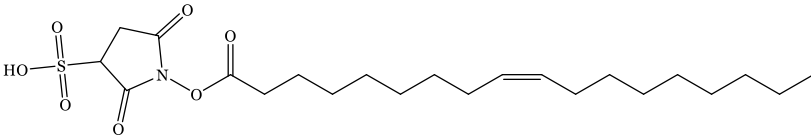
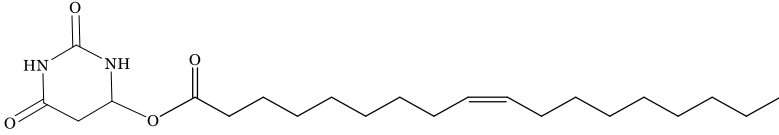
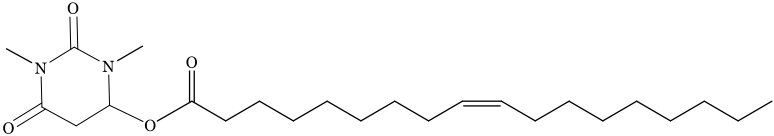
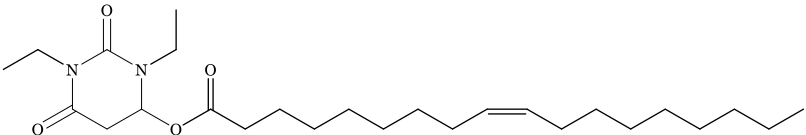


Esquema 2- Planejamento da síntese híbridos de (tio)barbituratos funcionalizados com AG, a partir da estrutura do SSO. Como exemplo de AG, a azul, está apresentado o ácido oleico.

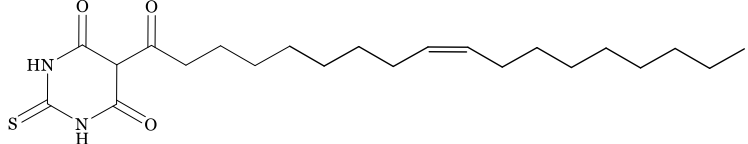
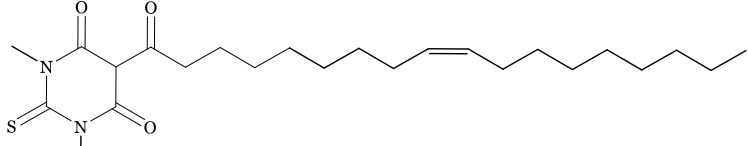
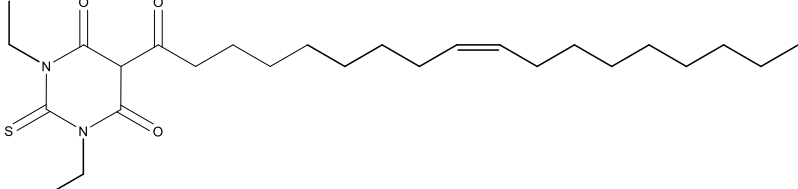
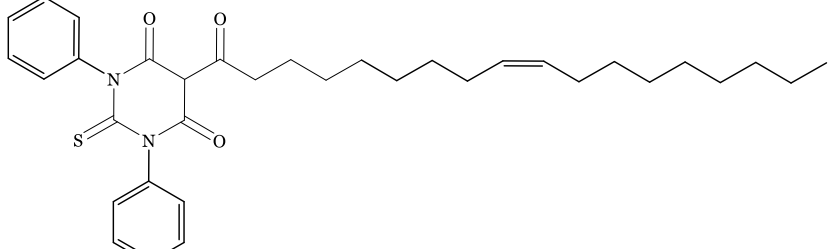
Na etapa de *design*, considerou-se a possibilidade de explorar diferentes funcionalizações ao nível dos azoto 1 e 3 dos (tio)barbitúricos, assim como a hibridização com os AG a partir de um dos carbonilos laterais ou no carbono5, que segundo o trabalho de Pesya *et al.*⁴⁷ Neste sentido, foi realizado um estudo de *docking* no *software* Autodock Vina utilizando as estruturas apresentadas na tabela 1, na qualidade de ligandos, e do CD36, na qualidade de recetor. De forma a prepara-se a proteína alvo de docking, consultaram-se dados providenciados na base de dados PDB, para identificar quais as cadeias proteicas corresponderiam à proteína CD36 e outras (macro)moléculas auxiliares que possam ter sido utilizadas no processo de cristalização. Uma vez que essas moléculas são interferentes do docking molecular, condicionando a sua realização, assim como a confiança dos

resultados. Desta forma, verificou-se que o CD36, correspondia à cadeia A e tinha sido co-nomedamente a proteína co-cristalizada PfEMP1, o ácido palmítico, a 2-acetamido-2-deoxi-beta-D-glucopiranosose, o 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol e o glicerol. Por último, para validação do docking foram consideradas estruturas de compostos cuja interação com o CD36 já tinha sido documentada na literatura, nomeadamente o AP5055, AP5156, AP5258 e SSO, cujas propriedades estão apresnetados na figura 7 e 8, uma vez que não há ainda disponível o CD36 co-cristalizado com um inibidor.

Tabela 1 – Representação estrutural dos compostos de referência e propostos e respetivas energias de ligação para com a proteína CD36.

Código	Estrutura	Energia de ligação (KJ.mol ⁻¹)
AP5055		-9,7
AP5156		-8,2
AP5258		-9,0
SSO		-7,3
1x		-5,8
1x-Me		-8,7
1x-Et		-7,4

1x-Ph		-7,5
1y		-7,9
1y-Me		-7,0
1y-Et		-5,0
1y-Ph		-7,5
1x		-6,2
2x-Me		-8,6
2x-Et		-8,5
2x-Ph		-7,4

2y		-8,1
2y-Me		-8,3
2y-Et		-8,3
2y-Ph		-6,9

Tendo em consideração os compostos de referência, observou-se que o AP5156 ligou-se no limite da entrada 2, enquanto isso, os restantes ligaram-se na bifurcação entre canais (figura 14). A conformidade entre a simulação anterior e o que acontece *in vitro* e que se encontra publicado para estas moléculas, permite a validação do modelo utilizado. De facto, o composto AP5156 não apresenta qualquer tipo de inibição *in vitro* do CD36, o que poderá ser explicado por esta molécula apresentar maior afinidade por outra região da proteína, relativamente ao centro ativo, algo que é apoiado com base numa energia de ligação comparável aos controlos positivos. Por outro lado, verifica-se que o SSO possui a menor energia de ligação, em módulo, comparativamente aos outros 3 compostos de referencia. No entanto, é preciso ter em conta que se sabe que o SSO se liga covalentemente à enzima, o que não é considerado nos cálculos efetuados pelo software usado no estudo.

Uma vez que se considerou que a validação anterior foi bem sucedida, avaliaram-se os parâmetros de energias de ligação, locais de "ligação", resíduos intervenientes e categorias de interações existentes. Finalmente compararam-se os resultados dos compostos de referência, apresentados na figura 14, com os resultados dos

compostos cuja a síntese estava projetada, (esquema 2). E apenas eram necessários os resultados do docking molecular para se avançar com a síntese. Assim, as 3 melhores estruturas foram as **1x-Me**, **2x-Me** e **2x-Et**, cujas as energias de ligação estão acima apresentadas na tabela 1.

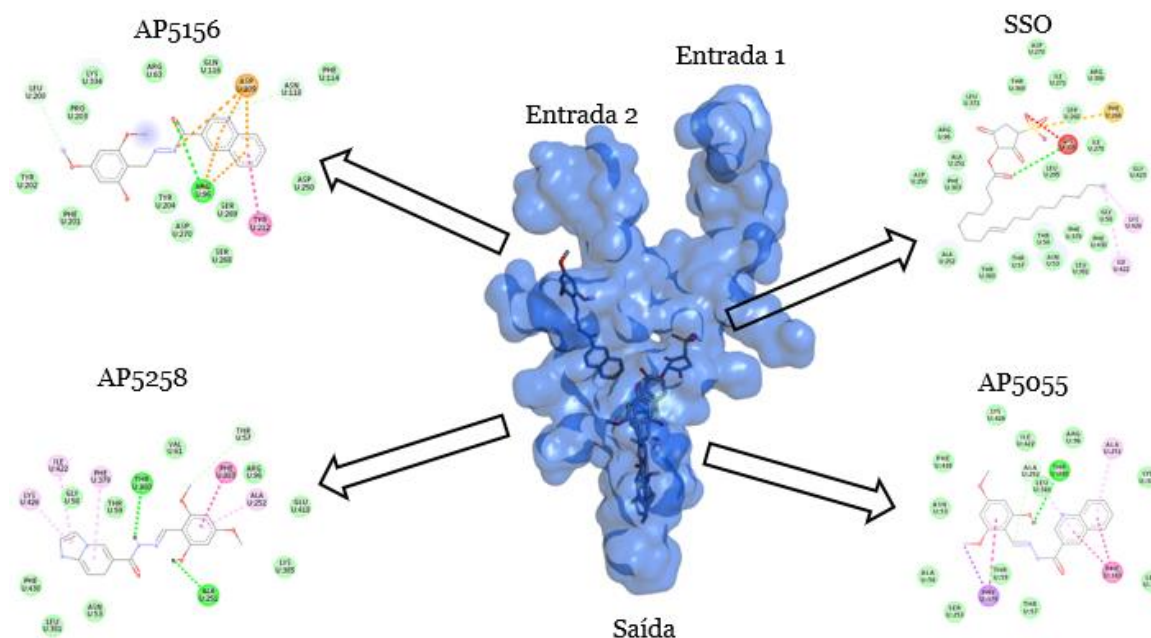


Figura 15- Representação dos canais que convergem no centro ativo, locais de ligação e resíduos que favorecem cada uma das interações dos compostos de referência, obtido através do *software* Discovery Studio.

4.1.2 Docking molecular pós-síntese

Tendo em consideração que nem todas as moléculas inicialmente propostas foram passíveis de serem sintetizadas, numa fase posterior às tentativas de síntese, foi realizado um *docking* molecular no CD36, visto tratar-se da proteína alvo. Tendo em mente a contribuição dos tautômeros ceto-enólicos mais prováveis dos híbridos dos ácidos barbitúricos, figura 15, essas estruturas foram incluídas no *docking* molecular.

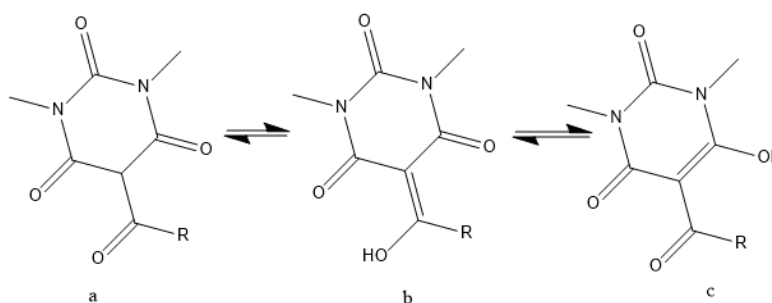


Figura 16-Estruturas mais prováveis dos tautômeros ceto-enólicos dos compostos **2**.

Segundo os resultados apresentados na figura 16, no geral, a forma cetona-enólica c é aquela que deverá apresentar maior atividade, sendo seguida pelas formas a e b. Por outro lado, a forma c parece demonstrar melhor a relação entre o tamanho da cadeia e a atividade, pois é a que possui menos oscilações. Não obstante, quaisquer estabelecimentos de EA requerem avaliações de outros dados quer de docking quer provenientes dos ensaios biológicos. Note-se que para efeitos comparativos apenas foram utilizados os resultados correspondentes a compostos cuja cadeia carbonatada é saturada.

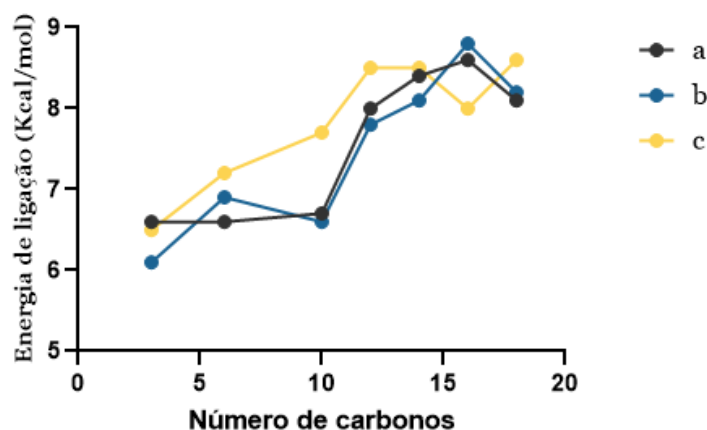


Figura 17- Relação entre energias de ligação, obtidas no Autodock Vina, o aumento da cadeia carbonada saturada do composto e as formas cetona-enólicas a, b e c.

Outro aspeto considerado no docking foi a tipologia e número de insaturações, tendo em mente que as estruturas passíveis de serem comparadas de forma mais fidedigna eram as que eram as estruturas dos derivados de AG com 18 carbonos. No entanto, uma apreciação dos dados de energias de ligação em função do número e tipo de insaturações mostra que as estruturas em causa em causa, **3ab(k-p)**, não demonstram relação entre estes 2 fatores.

4.1.3 Previsão de perfis farmacocinéticos e de druglikeness

Foi efetuada a simulação de propriedades farmacocinéticas e de toxicidade dos compostos em estudo, as quais se iniciam pela predição das propriedades físico-químicas, e, a partir daí, inferem-se possíveis interações relevantes estabelecidas *in vivo*. As simulações das interações referidas possibilitam a construção de um perfil de farmacocinético envolvendo os parâmetros absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET), e druglikeness através das ferramentas *online* PkCSM e SwissADME. Estas propriedades são imprescindíveis para se fazer uma pré-seleção dos compostos, tendo em conta a previsão da capacidade de uma dada molécula em atingir o alvo terapêutico pretendido numa quantidade suficiente para que surta o efeito terapêutico desejado e, simultaneamente, garantir que nem a molécula em questão, nem seus metabolitos coloquem em causa a segurança da sua futura aplicação. Neste âmbito, os trabalhos de Linpink *et al.* foram imprescindíveis, já que a famosa “regra dos cinco”, por ele estabelecida, criou uma relação de causa-efeito entre as propriedades físico-químicas, a farmacocinética e, conseqüentemente, a atividade potencial de um fármaco.⁵⁹

Assim, começou-se pela avaliação da absorção, considerando que ocorre ao nível do trato gastrointestinal (AGI) e que está intimamente relacionada com a solubilidade aquosa e lipídica dos compostos. Sendo previstos a partir do modelo Boiled-egg, que se trata de um modelo iterativo que se baseia na comparação dos valores do logaritmo do coeficiente de partição (LogP) e área superficial polar (ASP) simulados e os valores de compostos já descritos e que se encontram presentes numa base de dados.⁶⁰ Deste modo, torna-se possível prever a permeabilidade das moléculas testadas, primeiramente no duodeno e também através da barreira hematoencefálica. O resultado pode ser representado inserido num gráfico com a forma de um ovo cozido, que apresenta compostos com elevada permeabilidade através da barreira hematoencefálica (BHE) e absorção ao nível do trato gastrointestinal (AGI) na “gema” e a “clara” representa os que terão apenas uma boa AGI.⁶⁰ Analisaram-se ainda outros fatores condicionantes da absorção, nomeadamente o peso molecular e as interações com a glicoproteína-P (GP-P), que é um transportador de efluxo existente ao nível dos enterócitos e semelhante com os transportadores de efluxo presentes na BHE, condicionando a permeabilidades através destas (Figura 17).

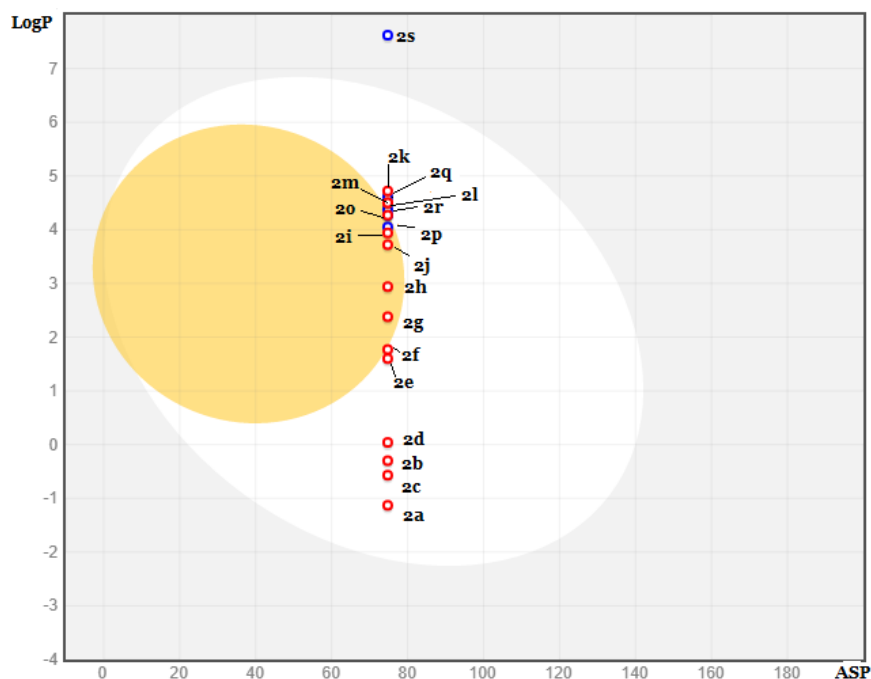


Figura 18- Gráfico Boiled Egg contendo a relação entre a ASP e LogP das moléculas **2a-s**. São apresentados dados de AI, permeabilidade através da BHE e afinidade pela GP-P (vermelho - não é substrato; azul - é substrato).

De acordo com a representação do gráfico *Boiled-Egg*, figura 15, é possível verificar que, dos compostos sintetizados, apenas o **2s** nem apresenta boa AI, nem permeabilidade através da BHE. Por outro lado, os compostos **2a-f**, **2k** e **2l** apresentaram apenas boa AI, mas não atravessam a BHE. Já os compostos **2g-j** e **2o-r** tem simultaneamente boa AI e potencialidade para atravessarem a BHE. Ainda é possível verificar que os compostos **2o-r** poderão ser substratos dos transportadores de efluxo da BHE. Tendo em consideração os dados anteriores, verifica-se que todos os compostos, com a exceção de **2s**, poderão vir a ser administrados oralmente. Por outro lado, é também constatado que eventuais aplicações futuras em patologias cerebrais poderão ser favorecidas para os híbridos de AG em estudo, cujas cadeias carbonadas contenham entre 12 e 16 carbonos, o que se verifica nos resultados referentes aos compostos **2g-r**.

No que diz respeito ao metabolismo, apreciaram-se as interações dos compostos para com as várias isoformas das enzimas da superfamília citocromo P450 (CYP450). De acordo com a tabela 2, os compostos com o aumento da cadeia carbonada, aparentam ter uma maior tendência para serem metabolizados pela isoforma CYP3A4. No entanto, este efeito é anulado em praticamente todos os compostos, pois verifica-se que à exceção dos compostos **2b** e **2s** todos os restantes compostos também conseguem inibir esta isoforma, o que vai aumentar a sua biodisponibilidade destes compostos. Adicionalmente, o facto de ser apresentada o potencial inibitório para, pelo menos, uma das isoformas de CP450, de todos os compostos à exceção de **2a-b** e **2s** poderá implicar a possibilidade de

interferência na metabolização de outros fármacos que sejam tomados em conjunto com as moléculas em estudo.

Tabela 2 – Predição das interações dos compostos **2a-s** para com as várias CYP450 através dos *softwares* online pkCSM e SwissADME.

Código do composto	Substrato de CYP450	Inibidor de CYP450
2a	-	-
2b	CYP3A4	-
2c	-	CYP1A2
2d	-	CYP1A2
2e	CYP3A4	CYP1A2, CYP2C19
2f	CYP3A4	CYP1A2, CYP2C19
2g	CYP3A4	CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4
2h	CYP3A4	CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4
2i	CYP3A4	CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4
2j	CYP3A4	CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4
2k	CYP3A4	CYP1A2, CYP3A4
2l	CYP3A4	CYP3A4
2m	CYP3A4	CYP3A4
2n	CYP3A4	CYP3A4
2o	CYP3A4	CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4
2p	CYP3A4	CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4
2q	CYP3A4	CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4
2r	CYP3A4	CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4
2s	CYP3A4	-

Quanto à excreção dos compostos, foram considerados os aspectos da excreção, (tabela 3), nomeadamente através da taxa de *clearance* renal (combinação das excreções renal e biliar) e pela determinação se algum dos compostos poderia ser substrato do transportador de cationes orgânicos renal (OCT2 – do inglês Organic Cation Transporter 2). Assim verificou-se que o aumento da cadeia carbonatada vai ser favorável à excreção, mas a que a componente renal deverá dever-se unicamente por filtração e não deverá ser mediada por proteínas transportadoras.⁵³

Tabela 3- Dados relativos à excreção dos compostos.

Código do composto	Clearance renal (log [ml/min.kg])	Substrato da OCT2
2a	0,45	Não
2b	0,342	Não
2c	0,501	Não
2d	0,489	Não
2e	1,664	Não
2f	1,774	Não
2g	1,716	Não
2h	1,812	Não
2i	1,827	Não
2j	1,867	Não
2k	1,884	Não
2l	1,924	Não
2m	1,924	Não
2n	1,964	Não
2o	1,964	Não
2p	2,011	Não
2q	2,103	Não
2r	2.148	Não

2s	1,653	Não
----	-------	-----

As toxicidades direta e indireta foram também simuladas, avaliando-se potencial a hepatotoxicidade, a toxicidade de AMES (mutagenicidade) e a capacidade de inibição de canais de potássio *herg* (do inglês, *ether-a-go-go-related gene*) 1 e 2, cuja inibição representa um grande risco de toxicidade cardíaca, sendo um dos principais critérios na aprovação ou não da aplicação de fármacos quer propostos, quer da retirada do mercado de alguns já utilizados.⁶¹

De acordo com os resultados apresentados (tabela 4), verifica-se que os compostos parecem apresentar alguma segurança para serem submetidos a estudos *in vivo*, uma vez que, conforme a simulação, nenhum apresenta potencial hepatotóxico, mutagénico e a maioria dos compostos não apresentará toxicidade cardíaca, através da inibição dos *herg*. Porém os compostos **2n-r** poderão inibir a isoforma 2 desta proteína, pelo que deverão ser feitos estudos suplementares no sentido de contornar/mitigar esta questão.

Tabela 4 - Dados relativos a potenciais toxicidades dos compostos.

Código do composto	Hepatotoxicidade	Toxicidade de AMES	Inibidor Herg I	Inibidor Herg II
2a	Não	Não	Não	Não
2b	Não	Não	Não	Não
2c	Não	Não	Não	Não
2d	Não	Não	Não	Não
2e	Não	Não	Não	Não
2f	Não	Não	Não	Não
2g	Não	Não	Não	Não
2h	Não	Não	Não	Não
2i	Não	Não	Não	Não
2j	Não	Não	Não	Não
2k	Não	Não	Não	Não
2l	Não	Não	Não	Não

2m	Não	Não	Não	Não
2n	Não	Não	Não	Sim
2o	Não	Não	Não	Sim
2p	Não	Não	Não	Sim
2q	Não	Não	Não	Sim
2r	Não	Não	Não	Sim
2s	Não	Não	Não	Não

Por fim, foram cruzados o perfil ADMET, acima descrito, com os dados referentes à *druglikness*, nomeadamente a formação de metabolitos e/ou existência de partes da estrutura que levem à existência de uma resposta inespecífica, com a simulação do ensaio de Pan para a interferência de compostos (PAINS - do inglês, Pan assay interference compounds).⁵⁴ E ainda foi verificada a aplicabilidade dos compostos através das regras de Lipinski.

De acordo com os dados apresentados, tabela 5, verifica-se que nenhum dos compostos parece ser suscetível de criar respostas inespecíficas, já que a simulação de PAINS não apresentou qualquer alerta. Por outro lado, apenas o composto **2s** não consegue

Tabela 5- Dados relativos a aspetos de *druglikeness* dos compostos.

Código do composto	Lipinski	PAINS
2a	Sim	o alertas
2b	Sim	o alertas
2c	Sim	o alertas
2d	Sim	o alertas
2e	Sim	o alertas
2f	Sim	o alertas
2g	Sim	o alertas
2h	Sim	o alertas

2i	Sim	o alertas
2j	Sim	o alertas
2k	Sim	o alertas
2l	Sim	o alertas
2m	Sim	o alertas
2n	Sim	o alertas
2o	Sim	o alertas
2p	Sim	o alertas
2q	Sim	o alertas
2r	Sim	o alertas
2s	Não, MM>500; logP>4	o alertas

4.2 Síntese dos híbridos de ácidos (tio)barbitúricos e AG

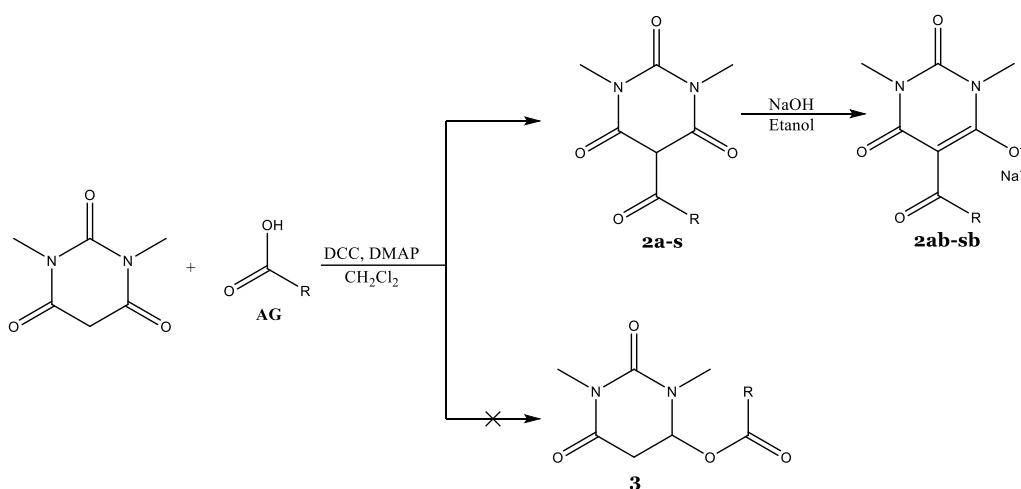
Inicialmente, estava prevista a síntese de vários compostos através do uso de diversos ácidos (tio)barbitúricos simétricos com diversas substituições ao nível dos seus azotos, assim como, também era pretendido realizar a hibridização entre esses mesmos ácidos (tio)barbitúricos e diversos AG de forma a se poder realizar um estudo mais abrangente sobre a contribuição das mudanças estruturais na relação estrutura-atividade, quer seja em termos de citotoxicidade, quer seja pela seu potencial inibitório sobre a proteína alvo, o CD36.

Em segundo lugar, como anteriormente foi referido, o planeamento da síntese passou também por um estudo prévio de docking, que, em princípio, iria direcionar os esforços e recursos para as vias sintéticas dos compostos cujas funcionalizações fossem mais promissoras.

Não obstante, como abaixo está apresentado tiveram de ser efetuados alguns ajustes com o avançar dos trabalhos de síntese, relativamente ao que estava inicialmente previsto, tendo a síntese passado a focar-se unicamente na obtenção de cetonas híbridas de ácido *N,N'*-dimetilbarbitúrico e de AG .

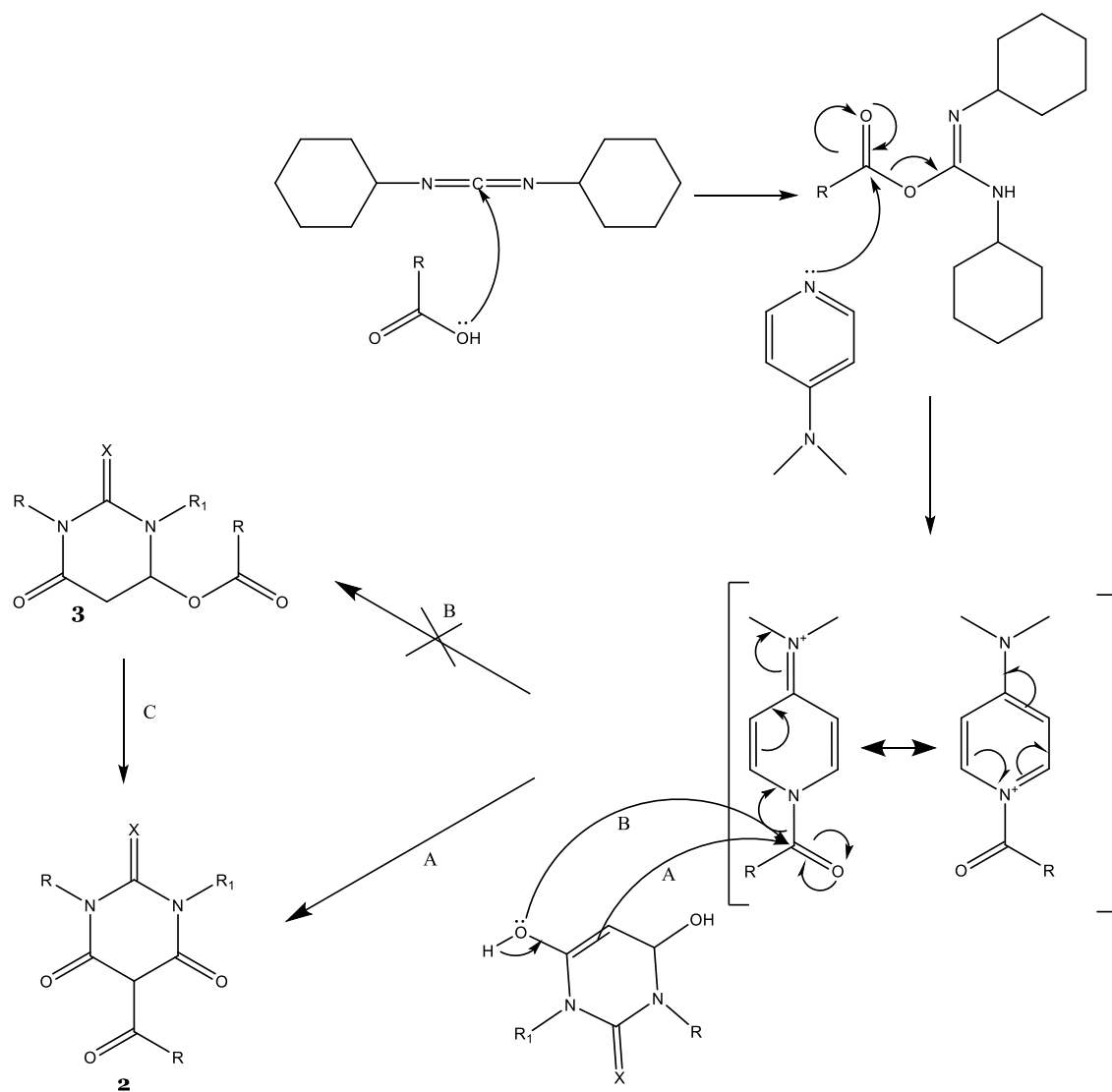
No que diz respeito à utilização exclusiva do ácido *N,N'*-dimetilbarbitúrico nas diversas tentativas de otimização das várias vias de síntese apresentadas no esquema 1, o motivo pelo qual foi selecionado em detrimento dos demais ácidos (tio)barbitúricos foi a sua maior solubilidade nos solventes reacionais que foram utilizados, e, conseqüentemente, devido aos rendimentos reacionais apresentados serem largamente superiores aos dos homólogos com diferentes funcionalizações ao nível dos azotos 1 e 3 (dados não apresentados). O mesmo foi verificado para os ácidos tiobarbitúricos homólogos. Foram ainda testados outros solventes inertes em relação às reações apresentadas na presente dissertação numa tentativa de serem incluídos produtos de outros ácidos (tio)barbitúricos funcionalizados com AG. No entanto, não houve sucesso nesse sentido.

Tendo em conta os resultados de síntese acima descritos, pode-se verificar que da síntese prevista, esquema 3, apenas os produtos **2** foram obtidos, algo que foi confirmado através de RMN de ¹H e de ¹³C, o que permitiu verificar que o produtos **3** não se formam, nem mesmo na qualidade de precursor do **2**, uma possibilidade que era descrita na literatura.⁴⁶ Assim, pensa-se que a metodologia sintética utilizada tenha evoluído no sentido de formação dos produtos **2** através do mecanismo reacional apresentado no esquema 4.



Esquema 3 - Síntese dos híbridos **2a-s** e respetivos sais de sódio (**2ab-sb**), por reação de condensação dos ácidos *N,N'*-dimetilbarbitúricos e AG, catalisada por DCC e DMAP. Não se verificou a formação do híbrido **3**.

Além disso, foi possível verificar que as sínteses dos produtos **2** e respetivos sais/enolatos de sódio foi bem conseguida, com rendimentos que vão de bons a excelentes, nomeadamente entre 42 e 92% em ambas as situações, como é possível observar na tabela 6. Simultaneamente, verificou-se uma elevada pureza, através dos dados espectroscópicos e p.f, o que permitiu que se partissem para os ensaios biológicos programados. Relativamente aos enolatos de sódio, a sua síntese deveu-se à necessidade de solubilizar os compostos em meio aquoso, algo que não era fácil de ocorrer na forma nativa das moléculas e que era primordial para se conseguir avançar para os ensaios *in vitro*.



Esquema 4 - Possíveis reações de condensação catalisadas pelo DCC e o DMAP. (Adaptado de Pesyan *et al.*⁴⁷) Rota reacional A daria origem ao produto **2**; Rota reacional B daria origem ao produto **3**, havendo possibilidade de transformação de **3** em **2** (rota C), pela adição de DMAP e CH₂Cl₂.

Tabela 6 – Dados referentes aos p.f. e η dos compostos resultantes. (1) Compostos na forma nativa; (2) Compostos na forma de sal sódico;

Código do composto	η (1)	p.f. (1)	η (2)	p.f. (2)
2a	82%	Óleo	75%	328-329
2b	87%	274-276	80%	320-322
2c	76%	Óleo	87%	255-257
2d	92%	Óleo	81%	230-331
2e	82%	33-34	63%	183-184
2f	62%	32-33	76%	180-182
2g	78%	49-50	65%	179-180
2h	85%	Óleo	73%	292-293
2i	79%	63-66	62%	172-173
2j	76%	Óleo	48%	175-177
2k	80%	66-67	42%	202-204
2l	75%	Óleo	81%	178-180
2m	50%	35-36	65%	184-186
2n	61%	Óleo	70%	130-132
2o	66%	Óleo	50%	189-191
2p	81%	Óleo	61%	132-133
2q	90%	Óleo	55%	97-99
2r	94%	Óleo	Degradado	-
2s	72%	Óleo	70%	231-233

4.3 Avaliação Biológica

Este subcapítulo tem como objetivo a apresentação e discussão dos resultados obtidos na determinação da atividade biológica dos produtos híbridos de ácidos *N,N'*-dimetilbarbitúricos e AG, tendo sido avaliada a sua atividade anti-proliferativa e a sua capacidade inibitória sobre a proteína alvo deste trabalho, o CD36. Para isso, foram utilizadas três linhas celulares, duas delas tumorais (LNCaP e PC3) e uma não-tumoral (PNT1A), de modo a realizar uma análise comparativa dos efeitos de cada composto para cada uma das condições em estudo.

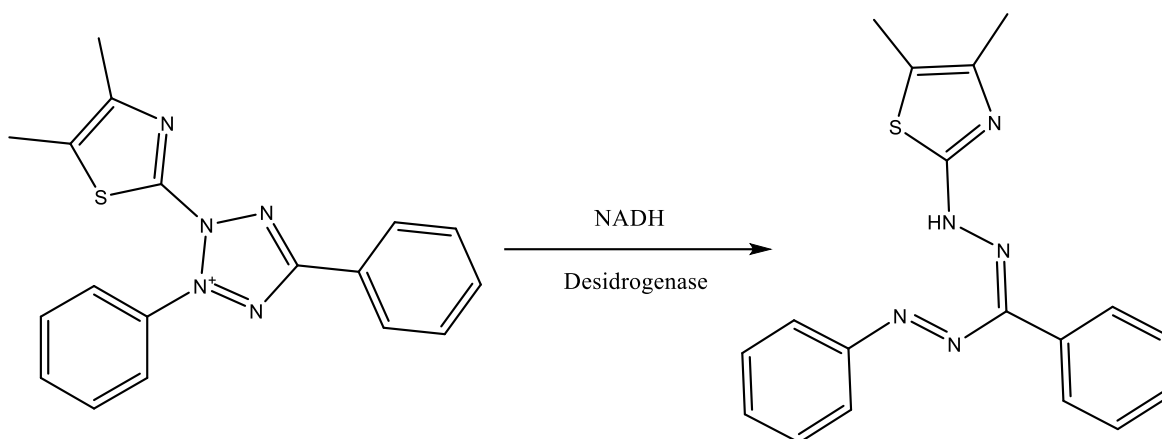
4.3.1 Avaliação do efeito dos compostos na viabilidade Celular

A avaliação dos efeitos dos híbridos em estudo na viabilidade celular e o estabelecimento de relações estrutura-atividade teve como base estudos apresentados na literatura para o SSO,⁶²⁻⁶⁶ composto que inspirou o desenvolvimento destes potenciais compostos bioisotéricos. Isto é, pretendia-se preparar compostos com propriedades bioativas semelhantes ao composto que serviu como inspiração e, eventualmente, com melhores características.

Com isto em mente, primeiramente, pelo método de MTT, foi realizado um screening inicial, nas concentrações de 10 e 50 μM , que serviu para a escolha dos compostos relevantes para determinação de IC_{50} . Neste sentido, o critério foi citotoxicidade relevante em qualquer grupo celular, e, eventualmente, seletividade para com alguma das linhas celulares utilizada, especialmente pelas duas linhas tumorais utilizadas.

4.3.1.1. Ensaio da viabilidade celular através de MTT

O MTT é um corante amarelo, solúvel em água, que atravessa facilmente as membranas de células viáveis e é reduzido principalmente pelas NADH desidrogenases mitocondriais, (figura).⁶⁷ Com esta redução, ocorre a formação de cristais de formazano azul-arroxeados, insolúveis em água. Considera-se que a redução do MTT a formazano é proporcional ao número de células vivas e à concentração de MTT.⁶⁷

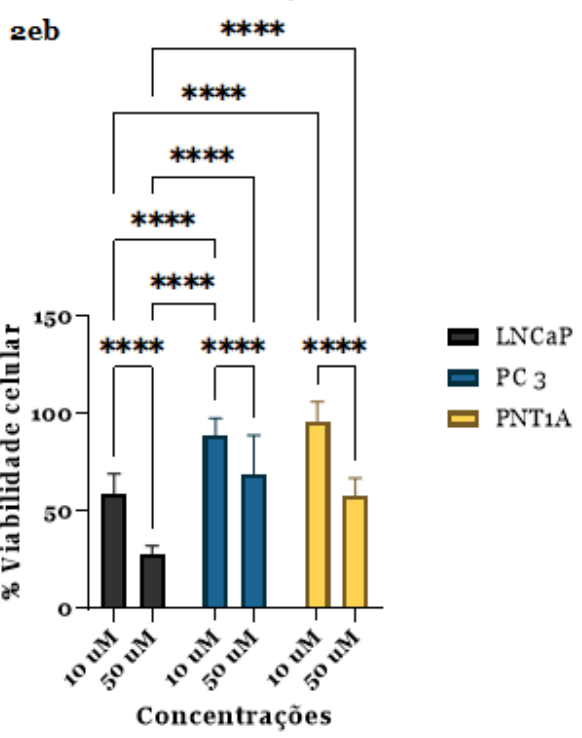
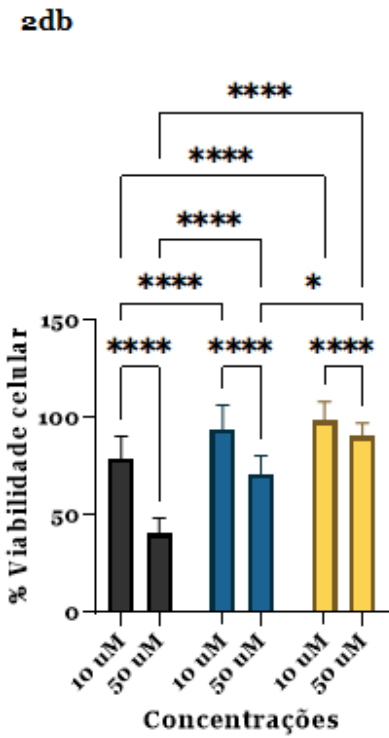
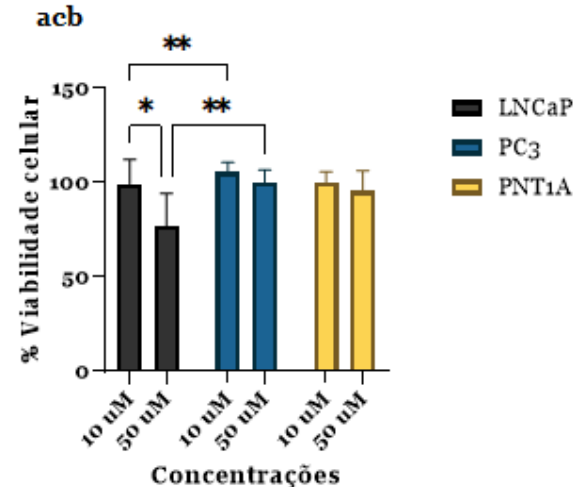
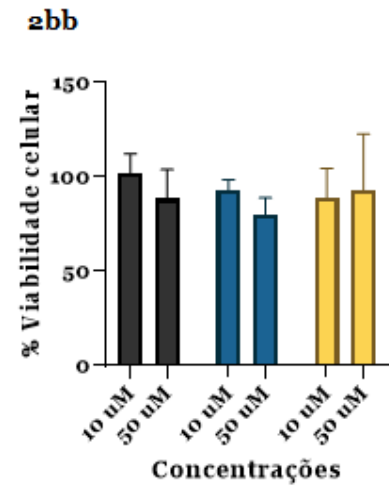
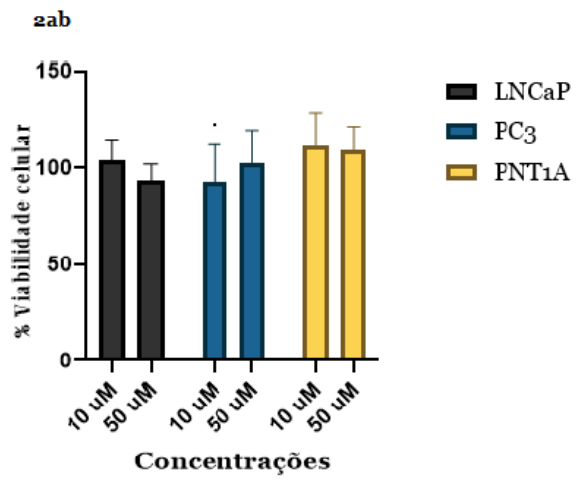
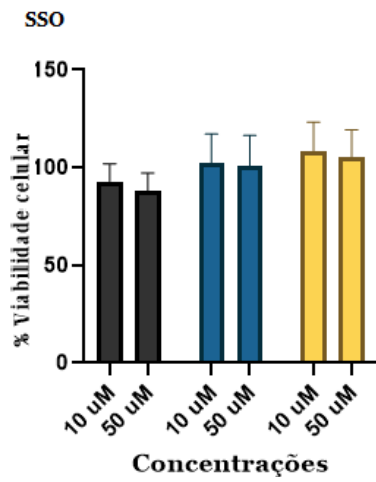


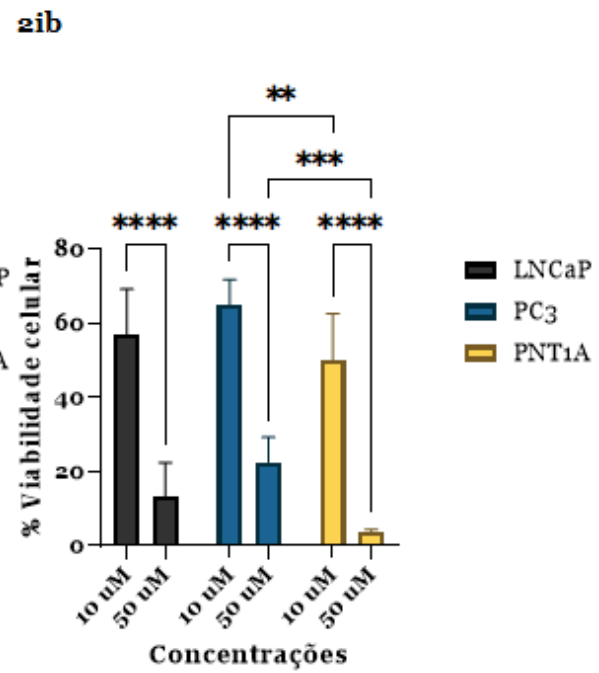
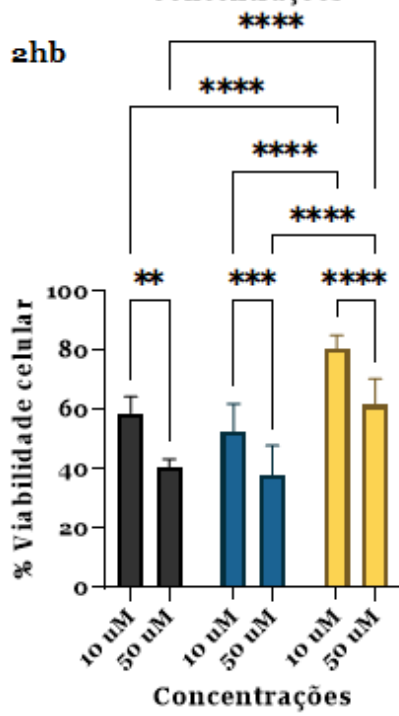
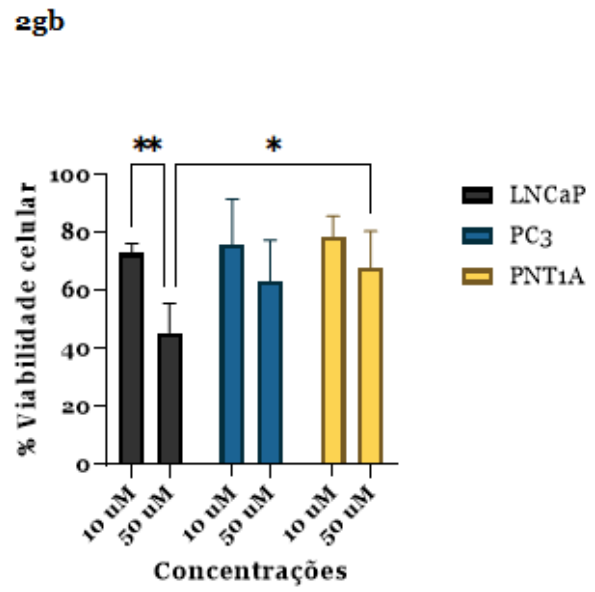
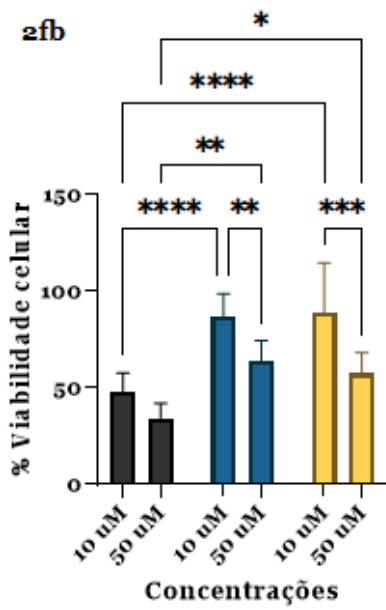
Esquema 5- Redução do MTT a formazano mediada pela NADH desidrogenase.

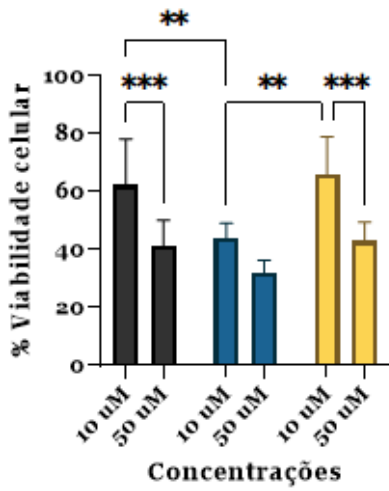
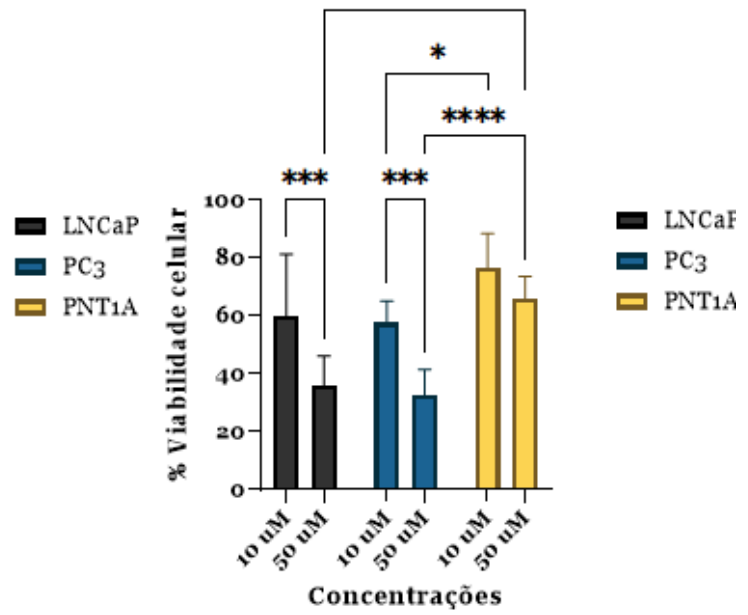
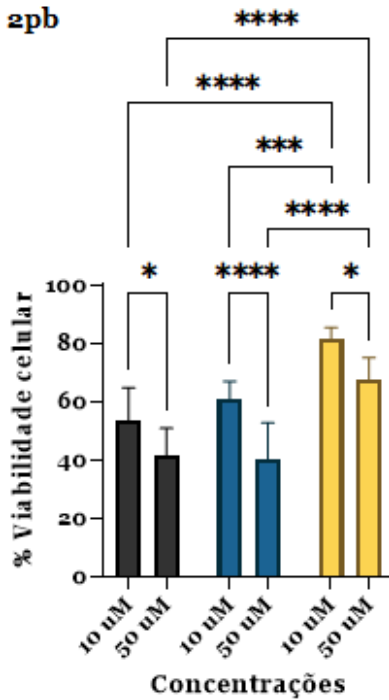
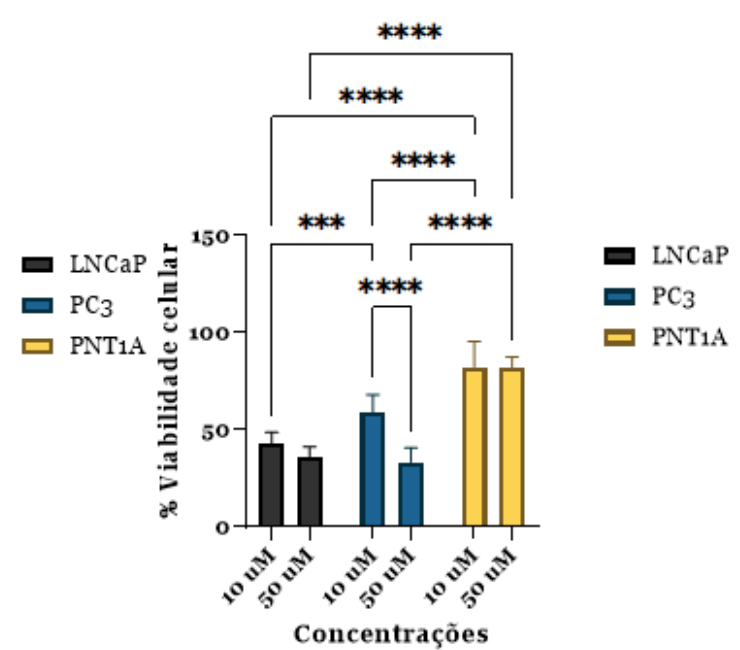
Como esta conversão ocorre nas mitocôndrias, a viabilidade celular é estimada a partir da atividade mitocondrial de células metabolicamente ativas. Para se proceder às medições colorimétricas dos cristais produzidos é necessária a dissolução dos mesmos em solventes orgânicos, como o dimetilsulfóxido (DMSO). Considera-se que esta absorvância é proporcional à quantidade de células vivas presentes por poço, o que permite avaliar e quantificar a viabilidade celular e, conseqüentemente, a capacidade antiproliferativa de cada composto. Este tipo de ensaio é maioritariamente utilizado para avaliar efeitos citotóxicos *in vitro* de compostos em estudo, testados em linhas celulares ou em culturas de células primárias de animais ou de humanos.

4.3.1.1.1. *Screening* inicial

Com este primeiro ensaio, selecionaram-se os compostos com maior potencial, baseado no critério de uma viabilidade inferior a 35 % a uma concentração de 10 μ M definida nas linhas prostáticas utilizadas, assim como o composto que parecesse apresentar a melhor seletividade para ambas as linhas celulares tumorais, relativamente à linha celular normal (Figura 11). Esta seleção foi essencial para reduzir os custos e o tempo despendidos com as etapas subsequentes neste estudo, nomeadamente a determinação dos IC_{50} referentes à viabilidade celular e, de seguida, a definição da gama de concentrações a utilizar na determinação do potencial inibitório de cada um dos compostos em estudo sobre a proteína alvo, o CD36.





2nb**2ob****2pb****2qb**

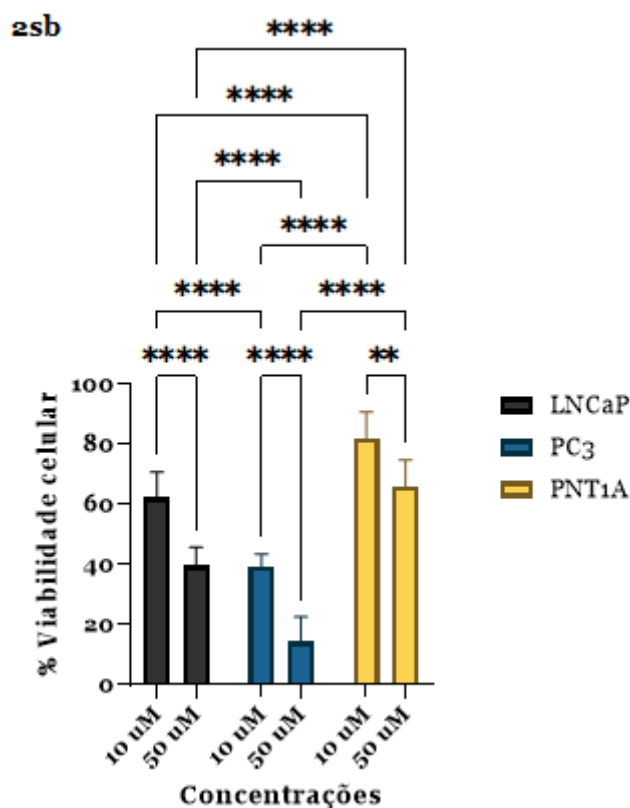


Figura 19- Percentagem de viabilidade celular aquando da exposição das linhas celulares LNCaP, PC3 e PNT1A a soluções às concentrações de 10 e 50 µM dos compostos **9ab-sb**, e do **SSO** (controlo negativo de citotoxicidade), durante o período de 24 horas. Os dados são apresentados com uma barra de erro \pm desvio padrão, representativos de 2 ensaios independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Estando p expresso relativamente à responsividade de cada uma das linhas celulares a um dado composto. ANOVA one-way, (Teste de turkey).

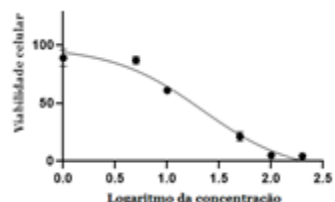
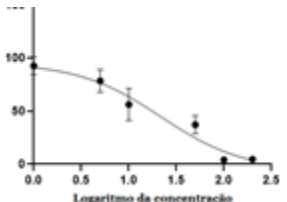
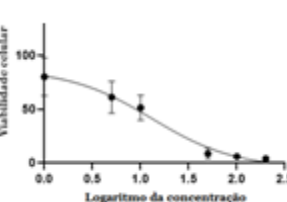
De acordo com os resultados anteriormente apresentados, na figura 19, é possível verificar a influência de diversas variáveis sobre as citotoxicidades apresentadas pelos diversos compostos. Estas incluem o tamanho da cadeia carbonada do AG original, o número de insaturações, a posição das insaturações e, finalmente, a dependência de androgénios. Esses aspetos estão mais aprofundados nos tópicos seguintes. Por outro lado, foram escolhidos os compostos **2jb**, **2kb**, **2lb**, **2mb** e **2qb** para avançarem para a determinação de IC_{50} .

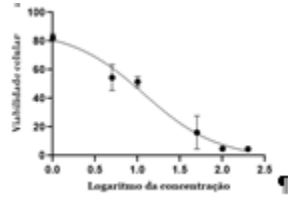
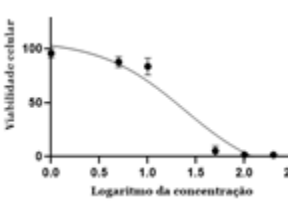
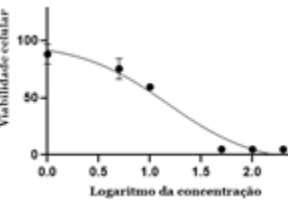
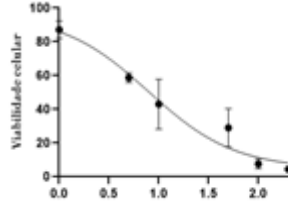
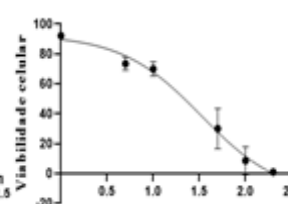
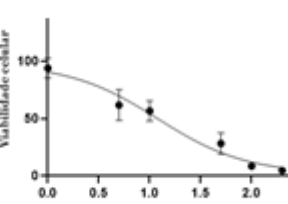
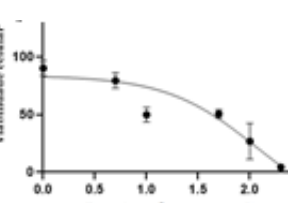
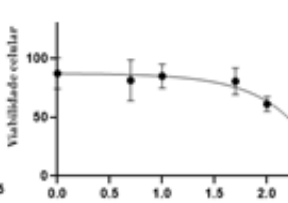
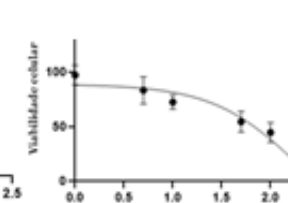
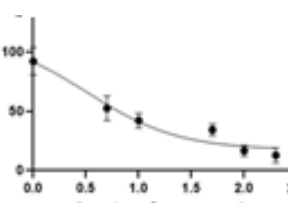
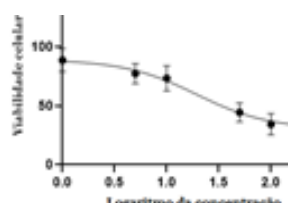
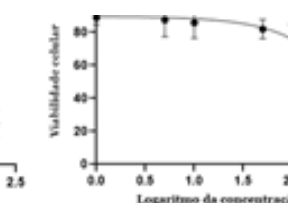
4.2.1.2 IC₅₀

Para determinar o IC₅₀, foram utilizadas 6 concentrações: 1, 5, 10, 50, 100 e 200 µM. Assim, esperava-se obter uma curva dose-resposta, e, conseqüentemente, determinar o valor do IC₅₀ dos compostos mais citotóxicos. Adicionalmente, esperava-se poder escolher a concentração mais indicada dos compostos sintetizados e de referência (SSO) para os ensaios de inibição enzimática (Bodipy-C16), de forma que citotoxicidade não fosse um fator condicionante dos resultados de inibição. O critério definido foi a existência de uma citotoxicidade inferior a 20 % em qualquer uma das linhas celulares em estudo.

Relativamente aos derivados de AG **2ab-sb**, geralmente, verifica-se, pela análise do screening que a citotoxicidade demonstrada é proporcional número de carbonos da cadeia carbonada que funcionaliza o C5 da estrutura do ácido *N,N'*-dimetilbarbitúrico. Isto pode ser confirmado nos resultados de IC₅₀ (tabela 7). No entanto, a citotoxicidade aumenta até atingir o seu auge nos 18 carbonos, mais especificamente no composto **2kb**. Por outro lado, verifica-se que a presença de insaturações parece condicionar negativamente a atividade anti-proliferativa. Porém, parece aumentar a sua seletividade para as células tumorais, sendo esta situação visível nos resultados de screening dos compostos **2jb**, **2kb**, **2nb**, **2ob**, **2qb** e **2s**. Embora neste caso os dados relativos ao IC₅₀, apenas permitam apoiar esta permissa no caso dos composto **2jb**, **2kb** e **2qb**, enquanto no composto **2mb** parece não se poder estabelecer uma relação

Tabela 7- Dados referentes aos IC₅₀ dos compostos cujo screening demonstrou citotoxicidade significativa.

Código	Linhas celulares		
	LNCaP	PC3	PNT1A
2jb			
IC ₅₀ (µM)	21.8	19,19	13,19
R ²	0,9741	0,9174	0,8914

2kb			
IC ₅₀ (μM)	11.95	23.94	15.03
R ₂	0,9491	0,9403	0,9506
2lb			
IC ₅₀ (μM)	36,84	35,6	9,46
R ₂	0,9430	0,9133	0,8946
2mb			
IC ₅₀ (μM)	113,6	N.D.	113,6
R ₂	0,8739	-	0,8739
2qb			
IC ₅₀ (μM)	3,287	19,35	N.D.
R ₂	0,8882	0,8483	-

Além, desse fator verificou-se a influência da posição das insaturações relativamente ao terminal cadeia carbonada adicionada aos compostos, vai diminuir a sua citotoxicidade, enquanto os derivados de AG omega 6 (**2kb**, **2nb-rb**) e omega 5 (**2hb**) parecem ter mais atividade do que o representante de derivado de omega 3, o que poderia evidenciar influência do CD36 nesta atividade, pois há alguns relatos que os AG omega 6 e o CD36 participam em algumas vias de sinalização em comum, especialmente o ácido araquidônico.

Diversos trabalhos descrevem a influência dos androgénios na resistência das células tumorais a alguns tratamentos.^{22,68} Assim, tendo em conta a dependência de androgénios na linha LNCaP e a falta desta condição na linha PC3, fez-se um estudo detalhado da influência da estrutura dos diversos compostos em relação à dependência de androgénios. Os resultados do *screening* dos compostos **2jb**, **2kb**, **2nb**, **2ob**, **2qb** e **2sb**, parecem indicar que através da semelhança entre a atividade anti-proliferativa verificada entre PC3 e LNCaP, que os compostos indicados, possam ter algum papel no combate à resistência conferida pela independência de androgénios, isto é, poderiam conseguir exercer um papel inibitório sobre a forma mutada do RA que é encontrada no fenótipo da linha celular PC3.⁶ Assim, poderia ser alvo de estudos computacionais e/ou *in vitro* no sentido de se tentar prever a eventual inibição sobre a forma nativa da proteína e formas mutadas e complementar este resultado.

4. 4 Avaliação do influxo de lípidos

A avaliação dos efeitos dos compostos sintetizados, **2a-s**, na inibição do CD36 foi também efetuada. A proteína alvo, o CD36, é o transportador maioritário de AG e se um composto apresentar uma atividade inibitória sobre esta proteína vão existir repercussões inequívocas no influxo de AGCL e AGCML extracelulares. Não obstante, na impossibilidade da observação direta do influxo de AG, foi utilizado o Bodipy-C16 como fluoróforo.^{58,69,70}

Com isto em mente, primeiramente, pelo método de bodipy-C16, foi realizado um estudo cinético, para determinar se haveria um influxo lipídico nas linhas LNCaP e PC3 com um perfil semelhante ao que fora anteriormente descrito em adipócitos, no trabalho de Wang *W. et al*, 2020.⁷⁰

Posteriormente, foi feita a avaliação da potência inibitória do influxo de AG dos compostos, utilizando o SSO como controlo positivo e o ácido *N,N*-dimetilbarbiturico, na qualidade de controlo negativo do influxo celular.

4.4.1 BODIPY

A técnica de Bodipy consiste na utilização de um análogo de um componente lipídico, que, é selecionado, consoante as vias de sinalização e/ou função de biomoléculas em estudo. Assim, na presente dissertação, foi utilizado o Bodipy-C16, cuja estrutura é apresentada na figura 20. Este composto é um análogo do ácido palmítico, tendo sido escolhido por ser transportado pelo CD36 e de outras proteínas transportadoras de AGCL ou AGCML.⁶⁹.

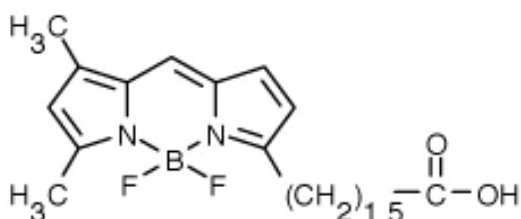


Figura 20- Representação estrutural do Bodipy- C16

A fluorescência característica deste composto na gama azul-verde (excitação: 485nm, emissão: 510 nm) proporciona não só a quantificação do influxo deste componente, mas também os locais na célula onde se vai ligar (com auxílio de microscopia confocal). Não obstante, trata-se de um procedimento inconclusivo relativamente à determinação da causa de qualquer variação do influxo de bodipy-C16, sendo que, quando se pretende tal dado, o estudo é associado a outros ensaios mais específicos.^{69,71}

4.4.2 Estudo cinético

Primeiramente, foi avaliado o perfil cinético do influxo de bodipy-C16, nas linhas celulares em estudo (LNCaP e PC3) para se verificar se seria semelhante ao descrito anteriormente em adipócitos.⁷² Os resultados deste estudo estão apresentados na figura 13.

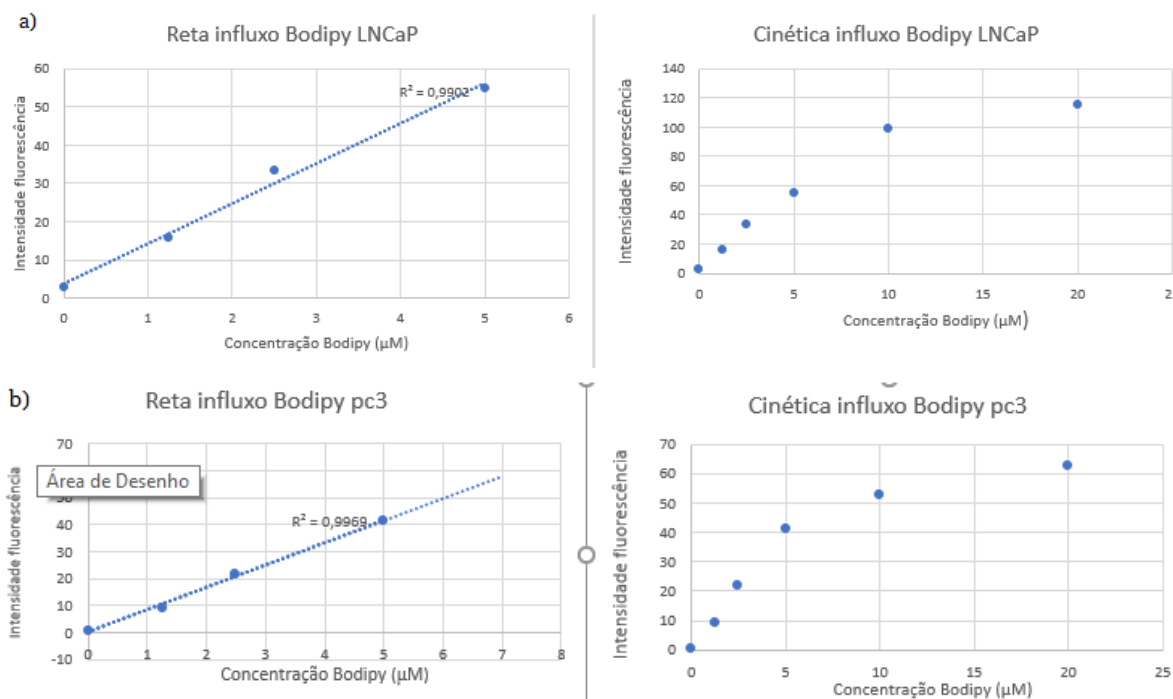


Figura 21- Cinéticas de influxo de Bodipy-C16 pelas linhas celulares e retas de calibração respectivas: (a) LNCaP e (b) PC3.

Os resultados apresentados anteriormente são concordantes com os que foram obtidos no trabalho⁷², que retratou o comportamento em adipocitos, tendo ainda sido verificado que a intensidade da fluorescência também se mostrou ser inversamente proporcional à área superficial das células em estudo, visto que as células LNCaP apresentam uma área superficial inferior às PC3.

4.4.3. Estudo de avaliação do influxo lipídico

Segundo os dados referentes ao *screening* da inibição do influxo lipídico, mais especificamente do seu análogo Bodipy-C16 (figura 22), não parece existir qualquer relação entre a estrutura e a inibição do influxo, já que todos os compostos aparentam ser capazes de exercer esta atividade. No entanto, o composto **2fb** destaca-se dos demais por ter uma atividade semelhante em ambas as linhas celulares estudadas, e também por apresentar uma inibição a 1 µM superior ao IC₅₀ composto de referência, isto é, de cerca de 48%, comparativamente aos 35% por parte do SSO a 25 µM. Visto que o *docking* molecular realizado no *software Autodock Vina* não permite estabelecer uma relação entre a inibição e uma maior energia e o facto da molécula **2fb** ocupar uma posição no centro ativo semelhante à obtida na simulação do SSO, sugere-se que este composto possa também apresentar uma inibição covalente. Mas para poder afirmar com mais certeza será necessário proceder-se a uma simulação com um *software* com outras

funcionalidades, tal como o GOLD, que tem vindo a ser utilizado no nosso grupo de investigação.

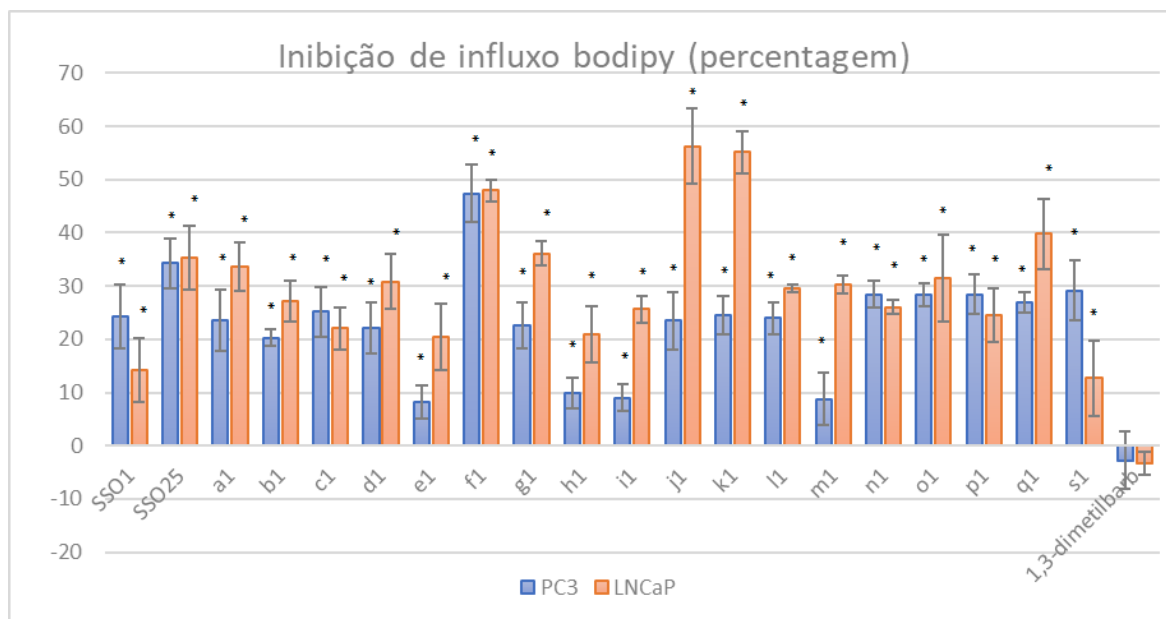


Figura 22- Percentagens de inibição do influxo lipídico nas linhas celulares tumorais de CPR, LNCaP e PC3, obtidas através da relação entre os ensaios fluorimétricos de Bodipy-C16 e Hoescht. Os compostos utilizados foram 2ab-sb (1 μ M), SSO (1 e 25 μ M) e ácido 1,3-dimetilbarbiturico (1 μ M). As barras de erro indicam a média \pm desvio padrão. Sendo estes dados representativos de dois ensaios independentes. Tendo todos * $p < 0,05$ em relação ao controlo negativo (ácido *N,N'*-dimetilbarbiturico).

Finalmente, pretendia-se verificar se haveria uma relação entre a inibição da entrada do bodipy-C16 com os compostos sintetizados e a atividade anti-proliferativa. Ao contrário do *docking* molecular, não se verificou qualquer indício que a inibição estivesse diretamente relacionada quer com a citotoxicidade, algo que era de esperar, de acordo com a literatura,^{28,29} já que apenas inibições praticamente totais do CD36, vão levar à citotoxicidade. No entanto, era esperado que os resultados da seletividade da atividade anti-proliferativa e os referentes ao screening do ensaio de inibição do influxo de AG, tivessem alguma relação.⁴⁰ Porém tal não se verificou, este facto pode evidenciar que poderão existir outros condicionantes, mas a determinação disso irá requerer ensaios suplementares.

5. Conclusão e perspectivas futuras

De acordo com os objetivos propostos inicialmente e, análise e discussão dos resultados obtidos em cada uma das metodologias, é possível afirmar que a maioria dos objectivos foram cumpridos.

A partir das tarefas de síntese foram obtidos 19 novos derivados híbridos de *N,N*-dimetilbarbituratos e AG (através da funcionalização no carbono 5 do esqueleto de dimetilbarbitúrico) e 18 enolato de sódio destes compostos. Para isso, foi utilizada uma via sintética rápida e fácil execução, o que permitiu a obtenção de bons rendimentos (42-92%) e ainda elevadas purezas. Todas as estruturas e graus de pureza respectivos foram controladas com RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , IV e p.f.

Nos ensaios relativos à avaliação biológica, (foram utilizados apenas os enolatos dos compostos sintetizados), verificou-se que o composto com maior atividade antiproliferativa é o barbiturato **2qb**, análogo do ácido araquidónico, que apresenta um IC_{50} de 3.29 μM para as linha celular tumoral LNCaP e de 19 μM na linha celular tumoral PC3, e teve baixa citotoxicidade na linha celular normal PNT1A, sendo prova da sua elevada seletividade.

Nos resultados de inibição de influxo de lípidos verificou-se que todos os compostos aparentam ter um efeito inibitório, sendo que o composto com propriedades inibitórias mais promissoras é o **2fb**, análogo do ácido 10-undecenóico, pois apresenta simultaneamente a melhor atividade inibitória, considerando ambas as linhas celulares estudadas. Tendo em consideração a atividade inibitória do composto **2fb** e o facto de o composto **2qb** possuir tanto atividade anti-proliferativa, como atividade inibitória sobre o influxo de lípidos, estes compostos deverão os melhores para terem a sua atividade inibitória avaliada em termos de IC_{50} .

No que diz respeito a perspectivas futuras, os compostos sintetizados aparentam ser bastantes promissores no contexto da proteína alvo desta dissertação. Não obstante, segundo dados reportados na literatura, tanto as abordagens terapêuticas visando o CD36, como outras proteínas envolvidas no influxo, ou metabolização de AG não devem ver o seu estudo cingido unicamente a células tumorais propriamente ditas, mas também devem incluir outros grupos celulares que fazem parte do microambiente tumoral, que aparentemente conseguem ter um papel crucial no desenvolvimento de cancros, nomeadamente adipócitos, células imunológicas e fibroblastos. Assim, técnicas envolvendo co-culturas de células tumorais e células estromais e ou macrófagos intra-tumorais poderão dar dados mais aproximados do que ocorre *in vivo*. Além disso, é de

notar que, tratando-se o CD36 do maior transportador de AG, os compostos em questão deverão ter potencial sobre outras disfunções que afetem diretamente ou indiretamente o metabolismo lipídico, tais como dislipidemias, obesidade, diabetes melitus, entre outras^{71,27} pelo que os compostos decorrentes da síntese apresentada e descrita na presente dissertação poderão ser também promissoras no contexto das patologias apresentadas.

No que diz respeito às vias sintéticas, e, conseqüentemente, aos produtos de síntese passíveis de serem obtidos e verem as suas propriedades descritas em trabalhos futuros. Poder-se-ia tentar criar híbridos com outras substituições ao nível dos azotos 1 e 3 dos ácidos barbitúricos originais, assim como explorar a utilização dos seu homólogos tiobarbitúricos. Adicionalmente, poderia visar-se diversas outras funcionalizações do C5 tanto com AG, como com compostos (bi)cíclicos com heteroátomos, tentando-se, deste modo verificar quais os fatores mais relevantes na relação estrutura-atividade dos compostos passíveis de serem sintetizados.

Relativamente aos compostos que se relevaram menos seletivos, mas que apresentaram elevada citotoxicidade, poderiam ser direcionados, no contexto tumoral, (CPr, ou de outros tecidos), através da sua incorporação em sistemas de entregas de fármacos, que os levariam diretamente para o microambiente tumoral e/ou meio intracelular (dependendo de qual fosse utilizado).³⁷

6. Referências bibliográficas

1. Guyton, Arthur; Hall, J. Tratado de fisiologia médica. in *Tratado de fisiologia médica* (ed. Elsevier Editors, L.) 999; (2006).
2. *Blandy Urology*. (Wiley Blackwell, 2019).
3. De Marzo, A. M. *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 256–269 (2007).
4. Shen, M. M. & Abate-Shen, C. Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges. *Genes Dev.* **24**, 1967–2000 (2010).
5. Maradonna, F. & Carnevali, O. Lipid metabolism alteration by endocrine disruptors in animal models: An overview. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 1–14 (2018).
6. Watt, M. J. *et al.* Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. *Sci. Transl. Med.* **11**, (2019).
7. Sp, N. *et al.* Nobiletin inhibits CD36-dependent tumor angiogenesis, migration, invasion, and sphere formation through the Cd36/Stat3/Nf-Kb signaling axis. *Nutrients* **10**, (2018).
8. Cardoso, H. J. *et al.* Revisiting prostate cancer metabolism: From metabolites to disease and therapy. *Med. Res. Rev.* 1–40 (2020) doi:10.1002/med.21766.
9. Mah, C. Y., Nassar, Z. D., Swinnen, J. V. & Butler, L. M. Lipogenic effects of androgen signaling in normal and malignant prostate. *Asian J. Urol.* **7**, 258–270 (2020).
10. Clement, E. *et al.* Adipocyte extracellular vesicles carry enzymes and fatty acids that stimulate mitochondrial metabolism and remodeling in tumor cells. *EMBO J.* **39**, 1–20 (2020).
11. Weinberg, R. (Whitehead I. for B. R. *The biology of cancer*. (Garland Science, Taylor & Francis Group, 2014).
12. Chemistry, T. Investigation of the Molecules Obtained from Marijuana: Computational Study of Spectral, Structural and Docking Burak TÜZÜN. **16**, 59–74 (2020).
13. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
14. Cucchi, D. *et al.* Fatty acids - From energy substrates to key regulators of cell

- survival, proliferation and effector function. *Cell Stress* **4**, 9–23 (2020).
15. Wang, J. & Li, Y. CD36 tango in cancer: Signaling pathways and functions. *Theranostics* **9**, 4893–4908 (2019).
 16. Ferreri, C., Sansone, A., Ferreri, R., Amézaga, J. & Tueros, I. Fatty acids and membrane lipidomics in oncology: A cross-road of nutritional, signaling and metabolic pathways. *Metabolites* **10**, 1–26 (2020).
 17. Kroemer, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* **3**, 614–620 (1997).
 18. Song, L. *et al.* Proto-oncogene Src links lipogenesis via lipin-1 to breast cancer malignancy. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
 19. Mohamed, M. F., Hassaneen, H. M. & Abdelhamid, I. A. Cytotoxicity, molecular modeling, cell cycle arrest, and apoptotic induction induced by novel tetrahydro-[1,2,4]triazolo[3,4-a]isoquinoline chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* **143**, 532–541 (2018).
 20. Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. & Rotter, V. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes and Cancer* **2**, 466–474 (2011).
 21. Follis, A. V. *et al.* The DNA-binding domain mediates both nuclear and cytosolic functions of p53. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 535–543 (2014).
 22. Selvaraj, D. *et al.* Syringaresinol as a novel androgen receptor antagonist against wild and mutant androgen receptors for the treatment of castration-resistant prostate cancer: molecular docking, in-vitro and molecular dynamics study. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **39**, 621–634 (2021).
 23. Hsieh, F. L. *et al.* The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
 24. Hanna E. Stevens, K. M. S. *et al.* Public Access NIH Public Access. *PLoS One* **32**, 736–740 (2010).
 25. Qiao, L. *et al.* Transcriptional regulation of fatty acid translocase/CD36 expression by CCAAT/enhancer-binding protein α . *J. Biol. Chem.* **283**, 8788–8795 (2008).
 26. Kuda, O. *et al.* Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages. *J. Biol. Chem.* **288**, 15547–15555 (2013).

27. Geloen, A. *et al.* CD36 inhibitors reduce postprandial hypertriglyceridemia and protect against diabetic dyslipidemia and atherosclerosis. *PLoS One* **7**, 1–12 (2012).
28. Feng, W. W. *et al.* CD36-Mediated Metabolic Rewiring of Breast Cancer Cells Promotes Resistance to HER2-Targeted Therapies. *Cell Rep.* **29**, 3405-3420.e5 (2019).
29. Liang, Y. *et al.* CD36 plays a critical role in proliferation, migration and tamoxifen-inhibited growth of ER-positive breast cancer cells. *Oncogenesis* **7**, (2018).
30. Kuda, O. *et al.* Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages. *J. Biol. Chem.* **288**, 15547–15555 (2013).
31. Józwiak, M., Filipowska, A., Fiorino, F. & Struga, M. Anticancer activities of fatty acids and their heterocyclic derivatives. *Eur. J. Pharmacol.* **871**, (2020).
32. Saini, R. K. & Keum, Y. S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sci.* **203**, 255–267 (2018).
33. Watson, J. E., Kim, J. S. & Das, A. Emerging class of omega-3 fatty acid endocannabinoids & their derivatives. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **143**, 106337 (2019).
34. De Oliveira, F. S. *et al.* Synthesis and antitumoral activity of novel analogues monastrol-fatty acids against glioma cells. *Medchemcomm* **9**, 1282–1288 (2018).
35. Venepally, V. & Reddy Jala, R. C. An insight into the biological activities of heterocyclic–fatty acid hybrid molecules. *Eur. J. Med. Chem.* **141**, 113–137 (2017).
36. Matias, M., Silvestre, S., Falcao, A. & Alves, G. *Recent Highlights on Molecular Hybrids Potentially Useful in Central Nervous System Disorders. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* vol. 17 (2016).
37. Irby, D., Du, C. & Li, F. Lipid-Drug Conjugate for Enhancing Drug Delivery. *Mol. Pharm.* **14**, 1325–1338 (2017).
38. Tundis, R. *et al.* An ancient remedial repurposing: synthesis of new pinocembrin fatty acid acyl derivatives as potential antimicrobial/anti-inflammatory agents. *Nat. Prod. Res.* **33**, 162–168 (2019).
39. Chrzanowska, A. *et al.* Anticancer and antimicrobial effects of novel ciprofloxacin fatty acids conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **185**, (2020).

40. Bhat, M., Jatyan, R., Mittal, A., Mahato, R. I. & Chitkara, D. Opportunities and challenges of fatty acid conjugated therapeutics. *Chem. Phys. Lipids* **236**, 105053 (2021).
41. Rasheed, H. Al *et al.* Barbiturate- And Thiobarbiturate-Based s-Triazine Hydrazone Derivatives with Promising Antiproliferative Activities. *ACS Omega* **5**, 15805–15811 (2020).
42. Serrano, J. L. *et al.* A synthetic route to novel 3-substituted-2,1-benzisoxazoles from 5-(2-nitrobenzylidene)(thio)barbiturates. *Comptes Rendus Chim.* **20**, 990–995 (2017).
43. Prasher, P., Sharma, M., Singh, S. P. & Rawat, D. S. Barbiturate derivatives for managing multifaceted oncogenic pathways: A mini review. *Drug Dev. Res.* (2020) doi:10.1002/ddr.21761.
44. Jursic, B. S. A simple method for Knoevenagel condensation of α,β -conjugated and aromatic aldehydes with barbituric acid. *J. Heterocycl. Chem.* **38**, 655–657 (2001).
45. Dhorajiya, B. D., Dholakiya, B. Z. & Mohareb, R. M. Hybrid probes of aromatic amine and barbituric acid: Highly promising leads for anti-bacterial, anti-fungal and anti-cancer activities. *Med. Chem. Res.* **23**, 3941–3952 (2014).
46. Jeong, Y. C. & Moloney, M. G. Antibacterial barbituric acid analogues inspired from natural 3-acyltetramic acids; Synthesis, tautomerism and structure and physicochemical property-antibacterial activity relationships. *Molecules* **20**, 3582–3627 (2015).
47. Noroozi Pesyan, N., Bagheri, M., Şahin, E. & Tunç, T. New fatty acid derivatives based on barbiturates and other cyclic β -dicarbonyl compounds and an acyl migration. *J. Iran. Chem. Soc.* **11**, 1429–1437 (2014).
48. Milite, C. *et al.* A novel cell-permeable, selective, and noncompetitive inhibitor of KAT3 histone acetyltransferases from a combined molecular pruning/classical isosterism approach. *J. Med. Chem.* **58**, 2779–2798 (2015).
49. Zhu, S. *et al.* The roles of sirtuins family in cell metabolism during tumor development. *Semin. Cancer Biol.* **57**, 59–71 (2019).
50. Katsamakas, S., Papadopoulou, A. G., Kouskoura, M. G., Markopoulou, C. K. & Hadjipavlou-Litina, D. Examining barbiturate scaffold for the synthesis of new agents with biological interest. *Future Med. Chem.* **11**, 2063–2079 (2019).
51. Hosseini, M., Chen, W., Xiao, D. & Wang, C. Computational molecular docking and virtual screening revealed promising SARS-CoV-2 drugs. *Precis. Clin. Med.* **4**, 1–16

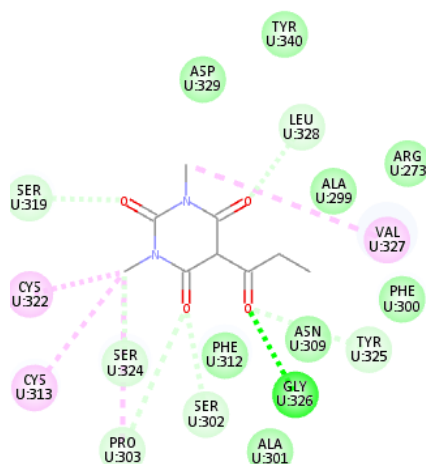
- (2021).
52. Agents, A. Molecular Docking Analysis of Caspase-3 Activators as Potential Anticancer Agents. 55–66 (2019) doi:10.2174/1573409914666181015150731.
 53. Purwanto, B. T., Siswandono, Kesuma, D., Widiandani, T. & Siswanto, I. Molecular modeling, admet prediction, synthesis and the cytotoxic activity from the novel n-(4-tert-butylphenylcarbonyl) benzamide against hela. *Rasayan J. Chem.* **14**, 1341–1350 (2021).
 54. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **7**, 1–13 (2017).
 55. Katsogiannou, M. *et al.* Integrative proteomic and phosphoproteomic profiling of prostate cell lines. *PLoS One* **14**, 1–25 (2019).
 56. Silva, G. R. *et al.* Sweet Cherry Extract Targets the Hallmarks of Cancer in Prostate Cells: Diminished Viability, Increased Apoptosis and Suppressed Glycolytic Metabolism. *Nutr. Cancer* **72**, 917–931 (2020).
 57. Brito, V., Santos, A. O., Almeida, P. & Silvestre, S. Novel 4-azaandrostenes as prostate cancer cell growth inhibitors: Synthesis, antiproliferative effects, and molecular docking studies. *Comptes Rendus Chim.* **22**, 73–83 (2019).
 58. Paulus, A. *et al.* Synthesis, radiosynthesis and in vitro evaluation of ¹⁸F-Bodipy-C16/triglyceride as a dual modal imaging agent for brown adipose tissue. *PLoS One* **12**, 1–13 (2017).
 59. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23**, 3–25 (1997).
 60. Daina, A. & Zoete, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem* 1117–1121 (2016) doi:10.1002/cmde.201600182.
 61. Lee, H. M. *et al.* Computational determination of hERG-related cardiotoxicity of drug candidates. *BMC Bioinformatics* **20**, (2019).
 62. Khan, S. & Kowluru, A. CD36 mediates lipid accumulation in pancreatic beta cells under the duress of glucolipotoxic conditions: Novel roles of lysine deacetylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**, 2221–2226 (2018).
 63. Zingg, J. M., Azzi, A. & Meydani, M. α -Tocopheryl Phosphate Induces VEGF

- Expression via CD36/PI3Ky in THP-1 Monocytes. *J. Cell. Biochem.* **118**, 1855–1867 (2017).
64. Jay, A. G., Simard, J. R., Huang, N. & Hamilton, J. A. SSO and other putative inhibitors of FA transport across membranes by CD36 disrupt intracellular metabolism, but do not affect FA translocation. *J. Lipid Res.* **61**, 790–807 (2020).
 65. Nicholls, H. T. *et al.* Hematopoietic cell-restricted deletion of CD36 reduces high-fat diet-induced macrophage infiltration and improves insulin signaling in adipose tissue. *Diabetes* **60**, 1100–1110 (2011).
 66. Cheng, J. J. *et al.* CD36 is a co-receptor for hepatitis C virus E1 protein attachment. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
 67. Liu, Y., Peterson, D. a, Kimura, H. & Schubert, D. Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J. Neurochem.* **69**, 581–593 (1997).
 68. Gray, B. P. *et al.* Tunable cytotoxic aptamer–drug conjugates for the treatment of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 4761–4766 (2018).
 69. Thumser, A. E. & Storch, J. Characterization of a BODIPY-labeled fluorescent fatty acid analogue. Binding to fatty acid-binding proteins, intracellular localization, and metabolism. *Mol. Cell. Biochem.* **299**, 67–73 (2007).
 70. Wang, W. *et al.* Scavenger receptor class B, type 1 facilitates cellular fatty acid uptake. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1865**, 158554 (2020).
 71. Hua, W. *et al.* CD36 mediated fatty acid-induced podocyte apoptosis via oxidative stress. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
 72. Somwar, R., Roberts, C. T. & Varlamov, O. Live-cell imaging demonstrates rapid cargo exchange between lipid droplets in adipocytes. *FEBS Lett.* **585**, 1946–1950 (2011).

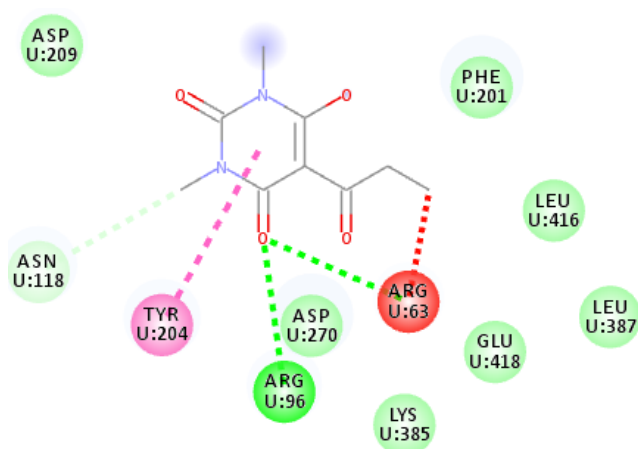
7. Anexos

7.1 Docking molecular com vina

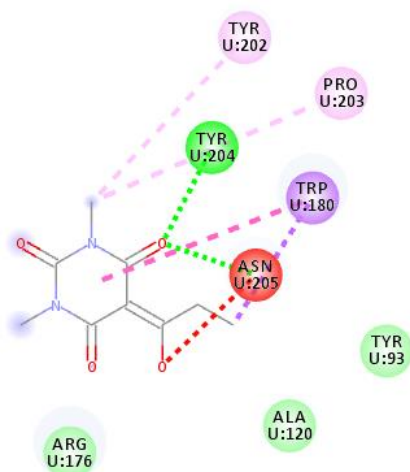
7.1.1. Representação das interações: *Discovery Studio*



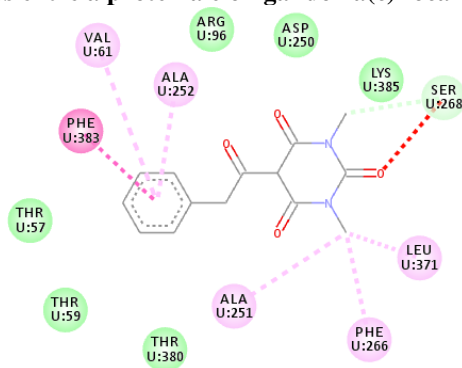
Anexo 01- Interações entre a proteína e o ligando 2a(a)-local de ligação do AP5156



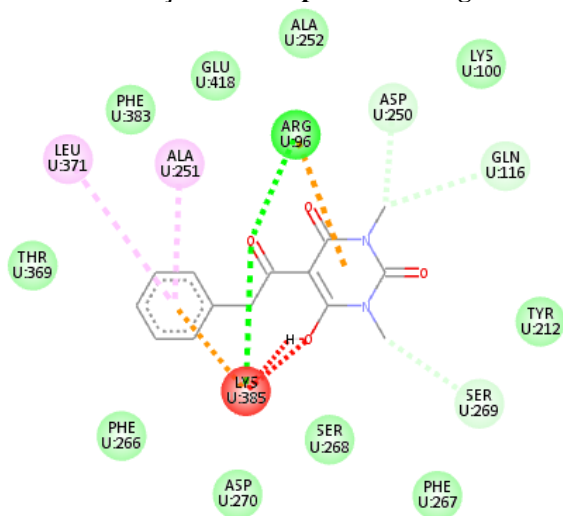
Anexo 0-2- Interações entre a proteína e o ligando 2a(b)-local de ligação do AP5156



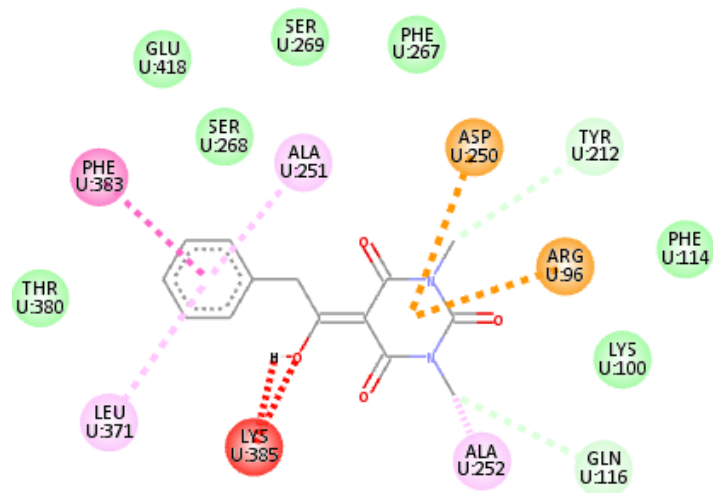
Anexo 0-3- Interações entre a proteína e o ligando 2a(c)-local de ligação do AP5156



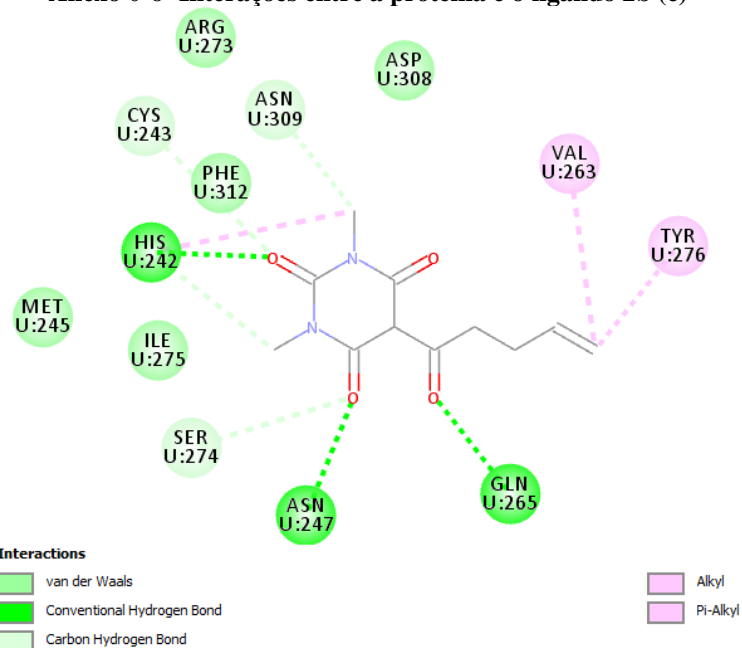
Anexo 0-4 Interações entre a proteína e o ligando 2b (a)



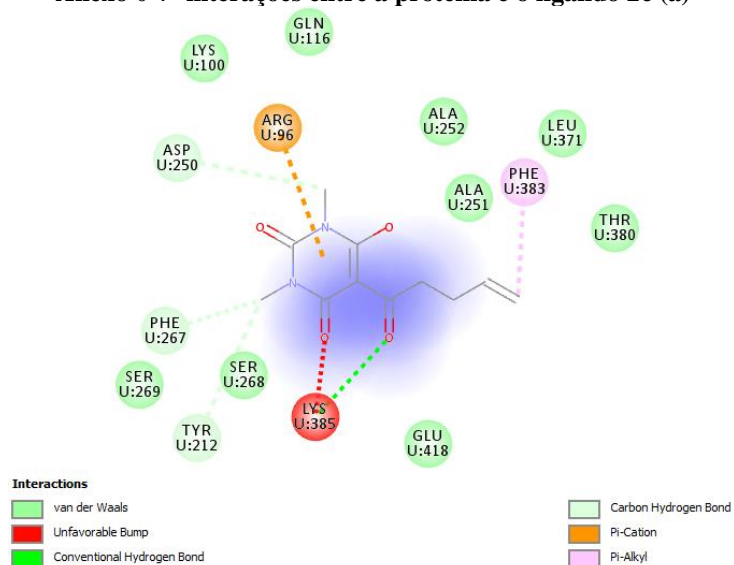
Anexo 0-5- Interações entre a proteína e o ligando 2b (b)



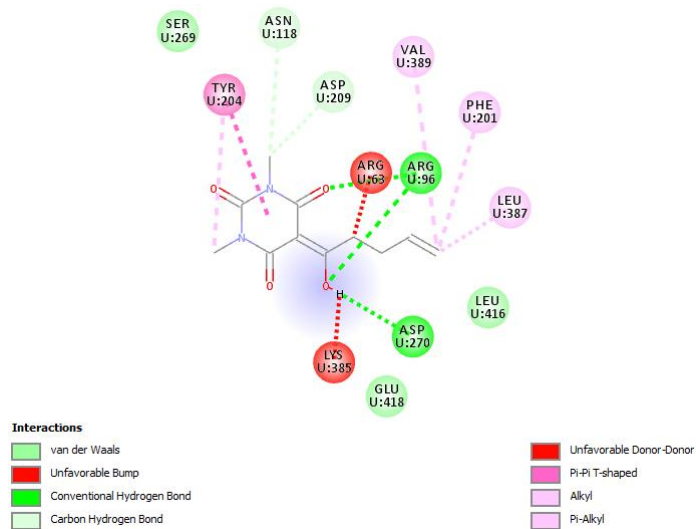
Anexo 0-6- Interações entre a proteína e o ligando 2b (c)



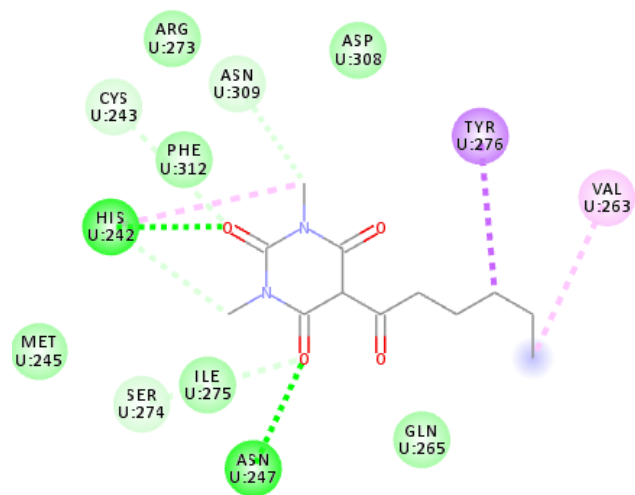
Anexo 0-7- interações entre a proteína e o ligando 2c (a)



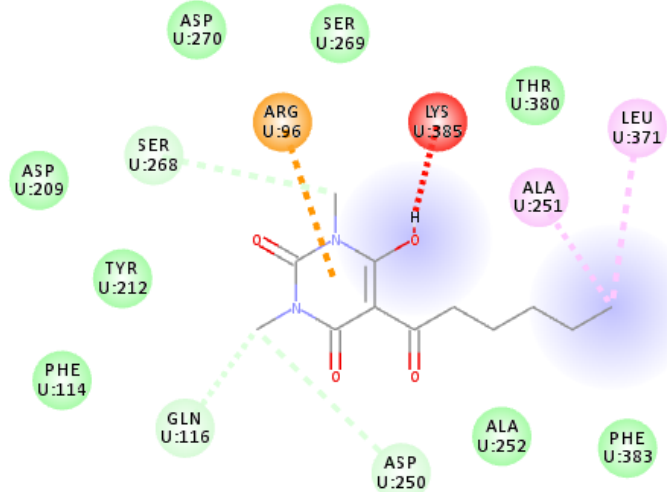
Anexo 0-8 interações entre a proteína e o ligando 2c (b)



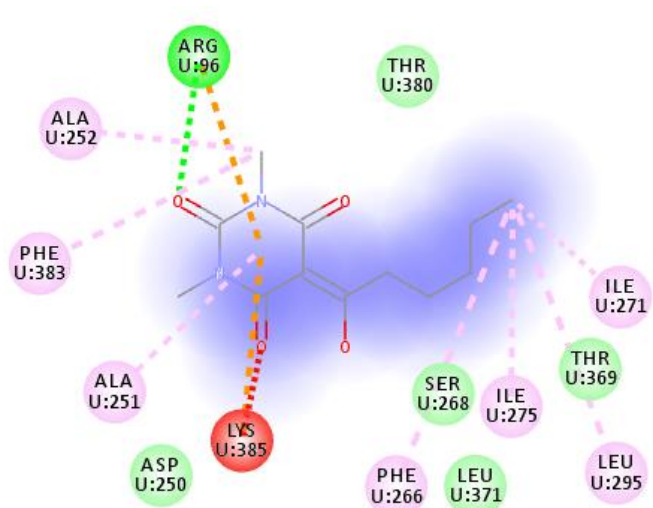
Anexo 0-90-10 interações entre a proteína e o ligando 2c (c)



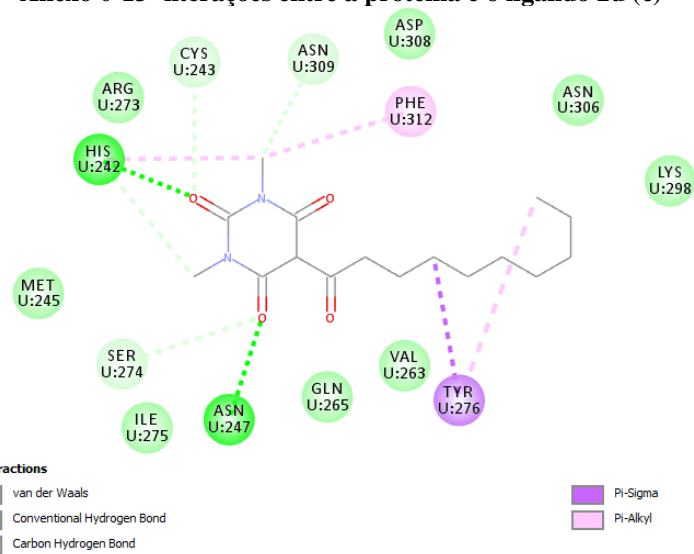
Anexo 0-11- interações entre a proteína e o ligando 2d (a)



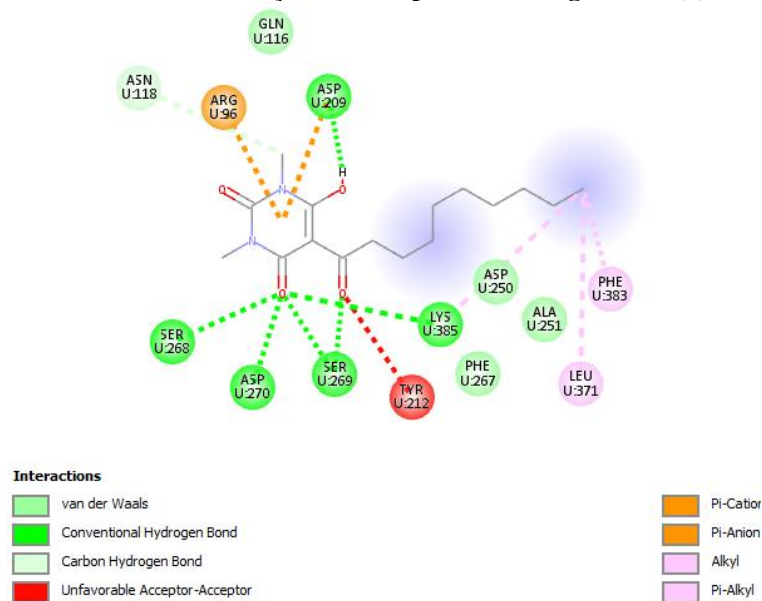
Anexo 0-12- - nterações entre a proteína e o ligando 2d (b)



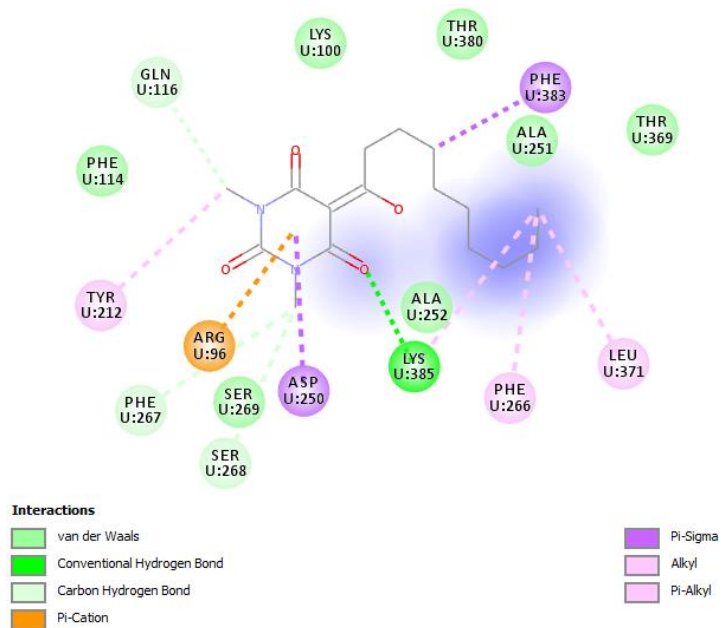
Anexo 0-13- interações entre a proteína e o ligando 2d (c)



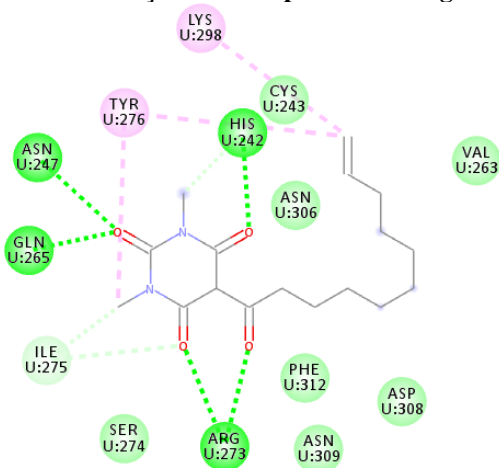
Anexo 0-14- interações entre a proteína e o ligando 2e (a)



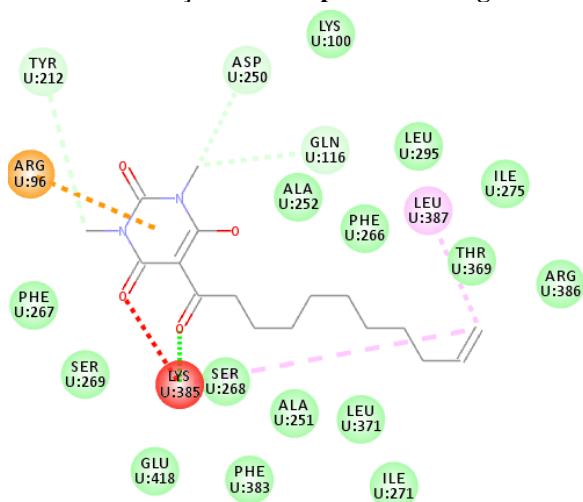
Anexo 0-15- interações entre a proteína e o ligando 2e (b)



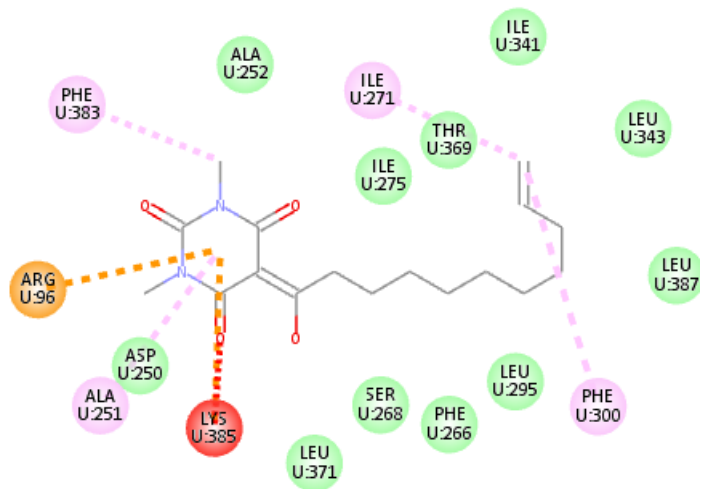
Anexo 0-16- interações entre a proteína e o ligando 2e (c)



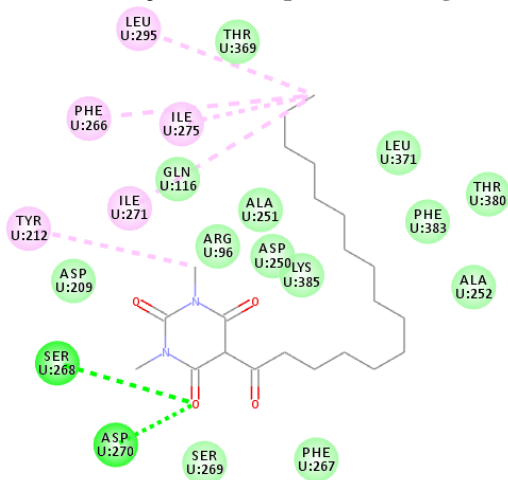
Anexo 0-17 nterações entre a proteína e o ligando 2f (a)



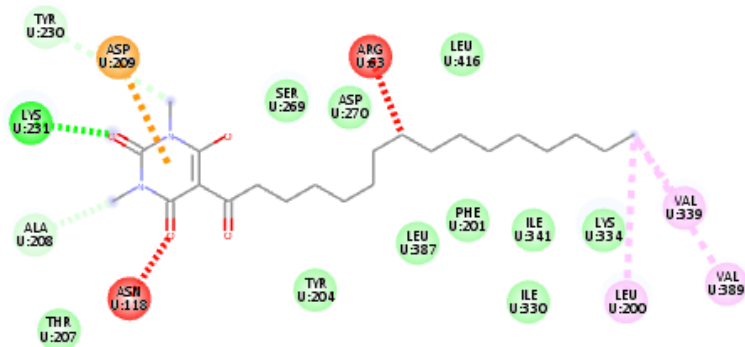
Anexo 0-18- nterações entre a proteína e o ligando 2f (b)



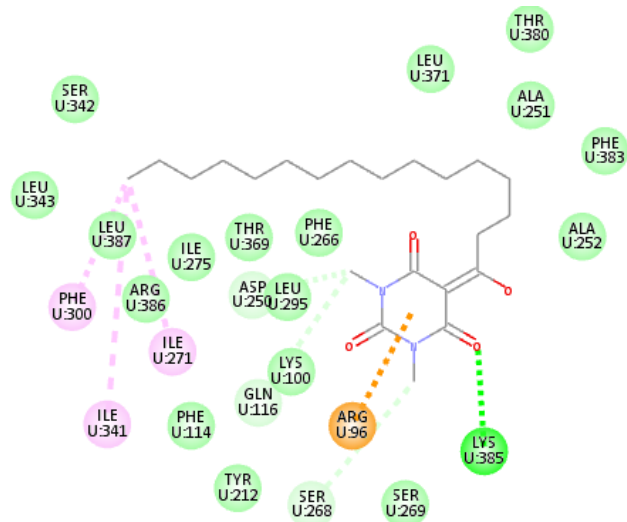
Anexo 0-19- nterações entre a proteína e o ligando 2f (b)



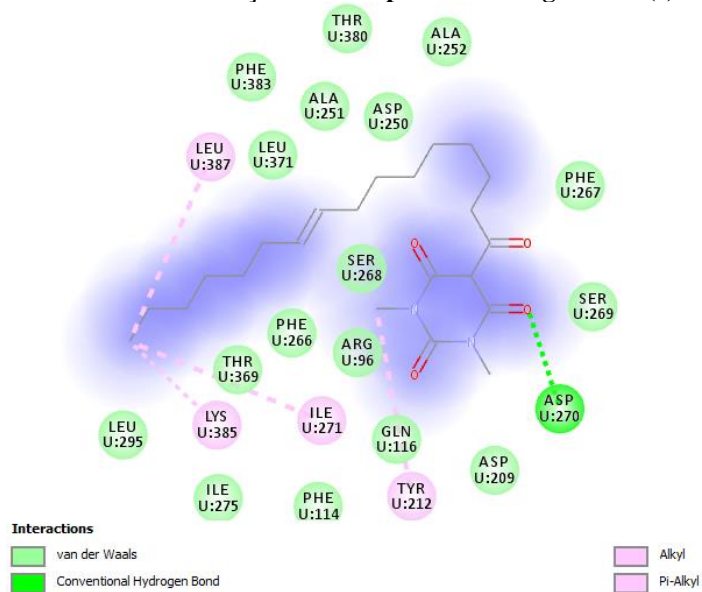
Anexo 0-20-Interações entre a proteína e o ligando 2i (a)



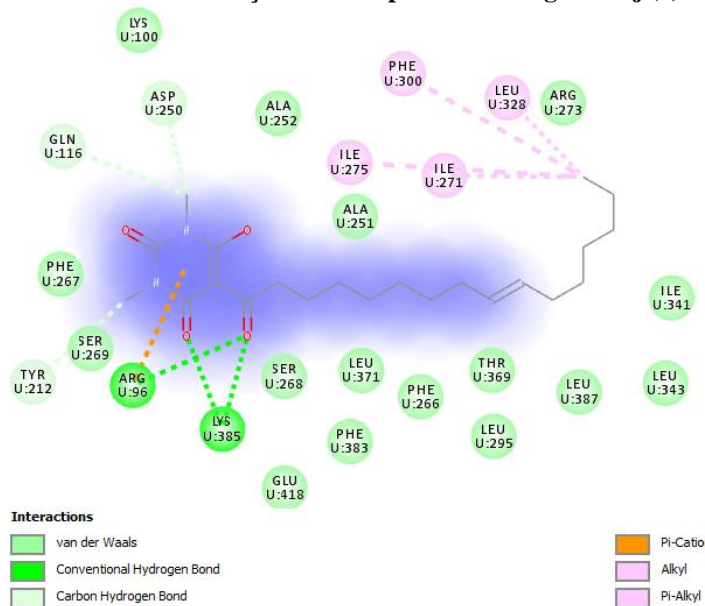
Anexo 0-21- -Interações entre a proteína e o ligando 2i (b)



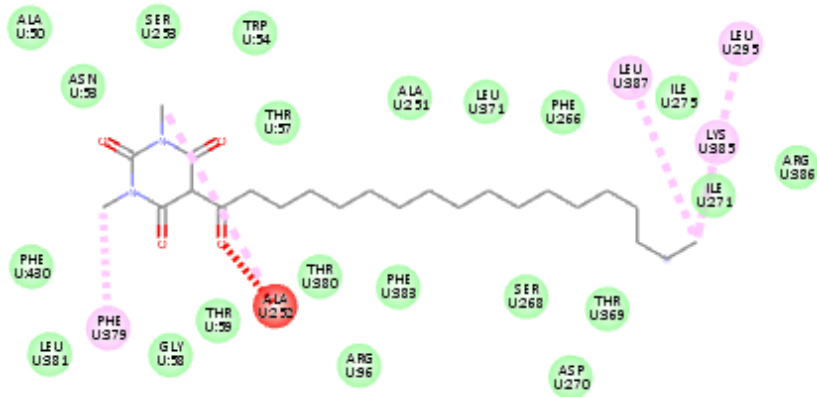
Anexo 0-22- Interações entre a proteína e o ligando 2i (c)



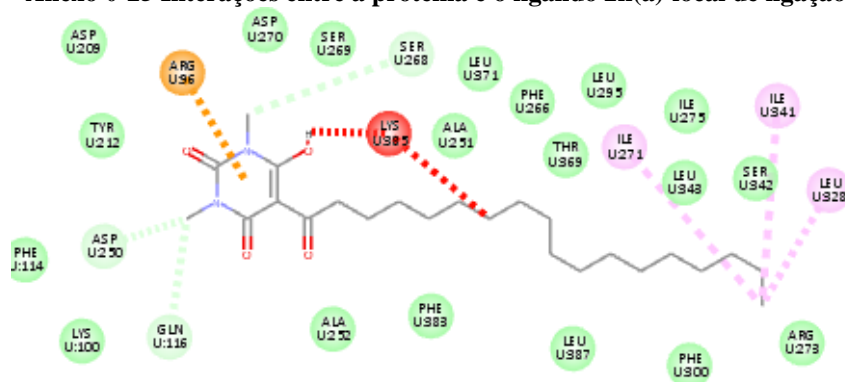
Anexo 0-23- Interações entre a proteína e o ligando 2j (a)



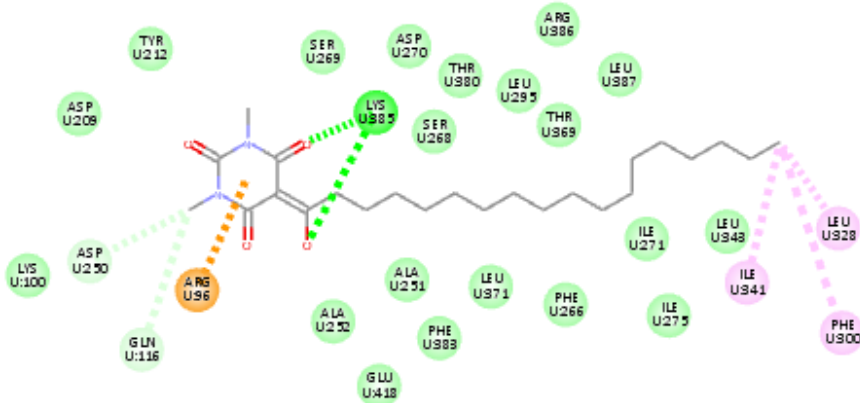
Anexo 0-24- Interações entre a proteína e o ligando 2j (b)



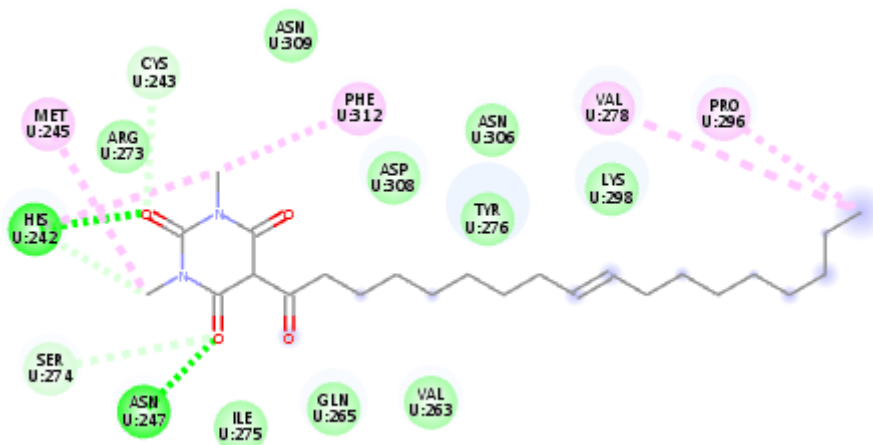
Anexo 0-25 Interações entre a proteína e o ligando 2k(a)-local de ligação



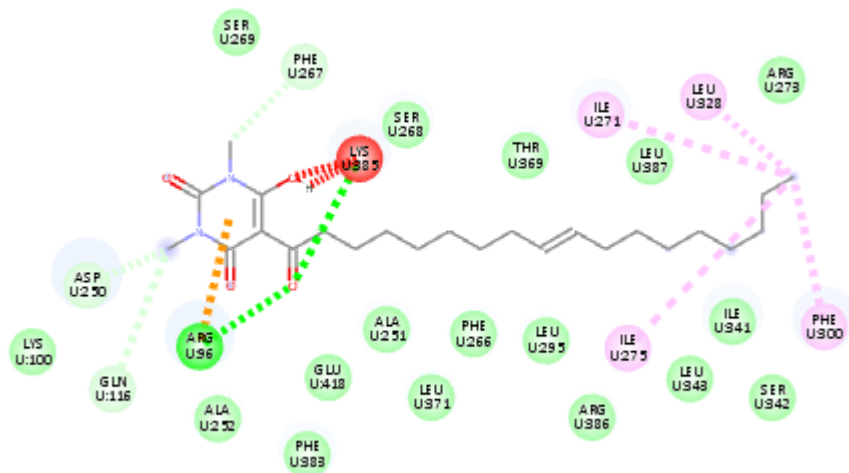
Anexo 0-26- Interações entre a proteína e o ligando 2k(b)-local de ligação



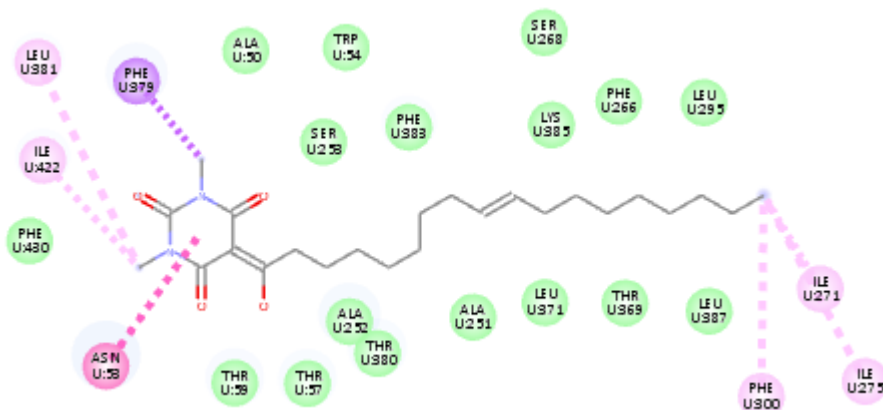
Anexo 0-27- Interações entre a proteína e o ligando 2k(c)-local de ligação



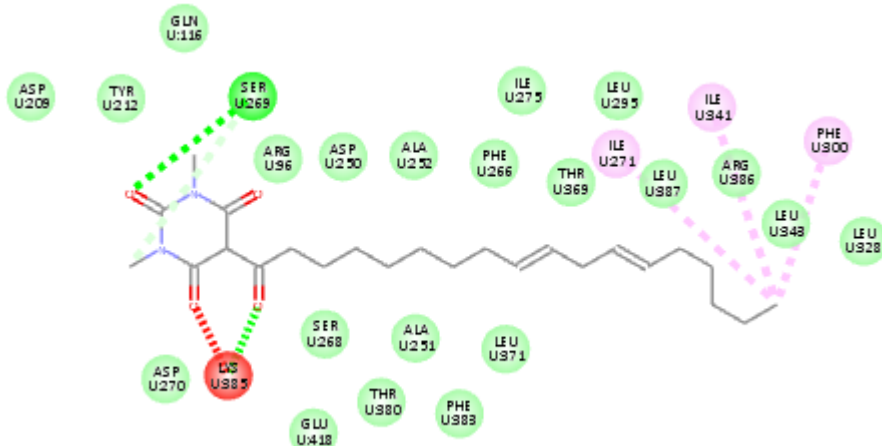
Anexo 0-28-Interações entre a proteína e o ligando 2l(a)-local de ligação do AP5156



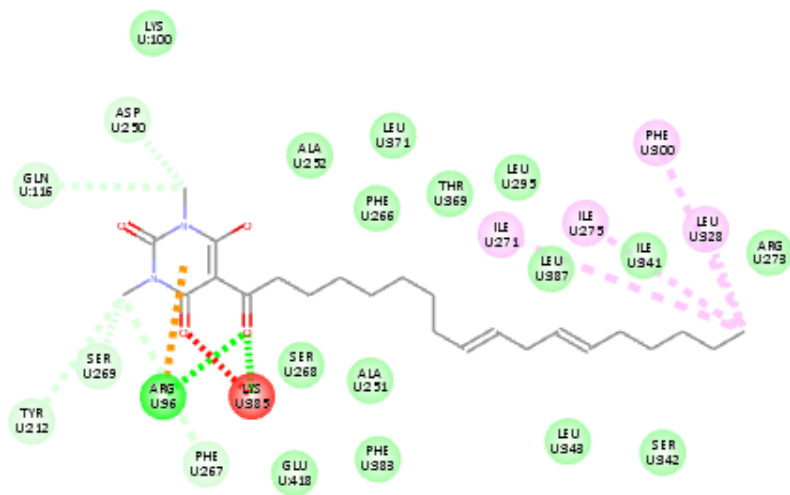
Anexo 0-29--Interações entre a proteína e o ligando 2l(b)-local de ligação do AP5258



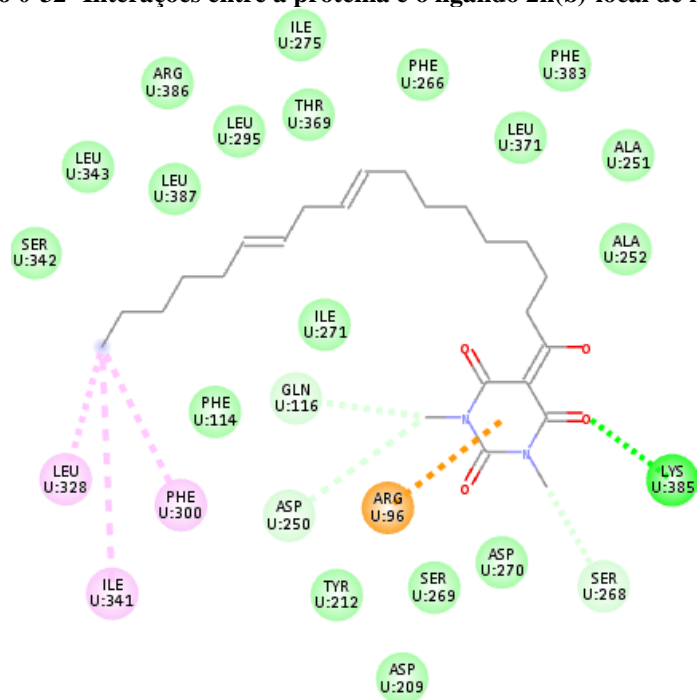
Anexo 0-30- Interações entre a proteína e o ligando 2l(c)-local de ligação do AP5258



Anexo 0-31- Interações entre a proteína e o ligando 2n(a)-local de ligação



Anexo 0-32- Interações entre a proteína e o ligando 2n(b)-local de ligação



Anexo 0-33 Interações entre a proteína e o ligando 2n(c)-local de ligação

7.2. - Publicações fora do âmbito da dissertação

Anexo 34.1- Resumo da comunicação em painel apresentada fora do âmbito desta dissertação



BIS-TIOBARBITURATOS INIBIDORES DA XANTINA OXIDASE PROMISSORES NO TRATAMENTO DA GOTA

**João L. Serrano^{a,b}, Diana Lopes^a, Renato E. F. Boto^{a,b}, Samuel Silvestre^{a,b,c},
Paulo Almeida^{a,b}**

a) CICS-UBI – Centro de Investigação em Ciências da Saúde - Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal; b) Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade da Beira Interior, Rua Marquês D'Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal; c) CNC – Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Rua Larga, 3400-537 Coimbra, Portugal.

Resumo

Os derivados do ácido barbitúrico e tiobarbitúrico têm chamado a atenção da comunidade científica devido à sua ampla gama de atividades biológicas, além das suas conhecidas atividades sedativo-hipnóticas. Recentemente, têm sido evidenciados os seus efeitos anticancerígenos, antivirais, antifúngicos, antimicrobianos e hipouricémicos. A produção elevada e/ou baixa excreção de ácido úrico pode levar à hiperuricemia e, subsequentemente, à condição denominada por gota. A xantina oxidase (XO), uma molibdenoflavoproteína que catalisa a hidroxilação oxidativa da hipoxantina e da xantina em ácido úrico, é o principal alvo para o tratamento desta patologia. Os principais fármacos utilizados no tratamento da gota são o alopurinol e o febuxostate, no entanto, apresentam diversos efeitos adversos. Assim, foi sintetizada uma série de trinta bis-tioarbituratos, com rendimentos de moderados a excelentes, em busca de novos inibidores da XO mais potentes e com menos efeitos colaterais. A capacidade inibitória da XO por parte dos bis-tioarbituratos sintetizados foi avaliada através de dois ensaios *in vitro* a 30 e 5 μM . A concentração inibitória a 50% (IC_{50}) foi determinada para as moléculas mais potentes. Curiosamente, o bis-tioarbiturato mais potente demonstrou IC_{50} inferior a 1 μM , demonstrando-se aproximadamente dezasseis vezes mais ativo que o fármaco comercial alopurinol. Por outro lado, foi ainda verificada *in vitro* a baixa citotoxicidade do referido bis-tioarbiturato.

Palavras-chave: Bis-tioarbituratos, Síntese Química, Hiperuricemia, Xantina Oxidase.

P15. *IN SILICO* IDENTIFICATION OF (THIO)BARBITURATES AS NOVEL POTENTIAL ANTIVIRAL DRUGS AGAINST SARS-COV-2

Samuel Dinis^(*), João L. Serrano¹, Paulo Almeida¹, Samuel Silvestre^{1,2}

¹ CICS-UBI – Health Sciences Research Center, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal.

² CNC – Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, Rua Larga, 3004-517 Coimbra, Portugal.

^(*)Email: sam.dinis1@gmail.com

ABSTRACT

Since the beginning of COVID-19 pandemic, SARS-CoV-2 virus had been responsible for the infection of more than 220 million people and more than 4.66 million deaths. SARS-CoV-2 is an enveloped, positive-sense, single-stranded RNA virus, wherein viral genome sequences integration into the DNA of host cells is possible. Two different types of viral entry are known: endocytosis or direct fusion between virus and cell plasmatic membrane. In the first case, the spike protein needs another protein as its receptor, namely the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) type 1. After entry, the viral genome is released in the cytoplasm and translated to viral polyproteins, which are processed by proteases, as papain-like protease (PLpro) or the main protease (Mpro), to form the replication complexes. These ways involve the targets considered the most encouraging for the development of antiviral drugs against SARS-CoV-2 infection and have been considered in *in silico* studies in this context. Now, ribavirin is the only drug approved by FDA and for this reason, it is clearly necessary to develop more efforts to discover new drugs or to adapt pre-existing ones. Recently, a computational study by molecular docking with auspicious results for some *N,N*-dihyl-2-thiobarbituric acid-based sulfonamides targeting the viral protein Mpro was published. Bearing this in mind, we decided to evaluate the therapeutic potential for SARS-CoV-2, of several (thio)barbiturate derivatives, synthesized and described in previous works made by our research group, namely their Mpro inhibition or ACE2 targeting. Molecular docking studies using GOLD software and absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity parameters using webtools pkCSM and SwissADME were performed for sixty-six (thio)barbiturate derivatives.

Acknowledgements: This work is supported by funds from the Health Sciences Research Center (CICS-UBI) (UID/Multi/00709/2019) through National Funds by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). FEDER funds also support this work through the POCI-COMPETE 2020-Operational Programme Competitiveness and Internationalization in Axis I–Strengthening research, technological development, and innovation (Project No. 007491). It is also acknowledged founding from C4-Cloud Computing Competences Center project (CENTRO-01-0145-FEDER-000019). J. L. Serrano acknowledges a doctoral fellowship grant from FCT (SFRH/BD/148028/2019).

Keywords: SARS-CoV-2, Antivirals, (Thio)barbiturates, Molecular docking.